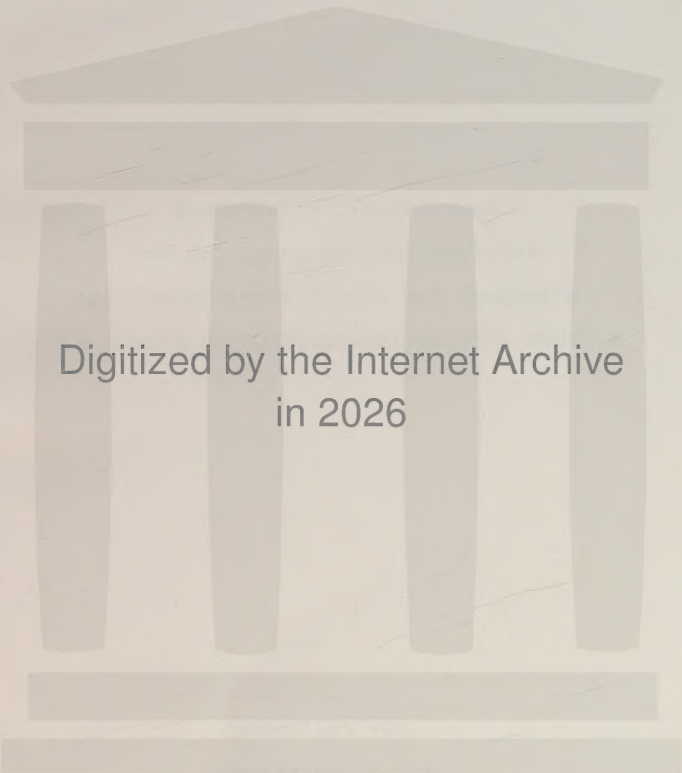


Aminoacylierung von
isolierten und von kombinierten Fragmenten
der $\text{tRNA}^{\text{Ala}}_1$ aus Hefe und der
 $\text{tRNA}^{\text{Val}}_1$ aus E. coli

Christine Lossow

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aminoacylierung von isolierten und von kombinierten
Fragmenten der tRNA^{Ala}₁ aus Hefe und der tRNA^{Val}₁ aus E.coli

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Christine Lossow

aus München

München 1975



- | | |
|----------------------|------------------------|
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. H. G. Zachau |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. G. Hartmann |

Tag der mündlichen Prüfung: 30.6.1975

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München in der Zeit von Mai 1972 - Dezember 1974 ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. G. Zachau danke ich vielmals für die Förderung dieser Arbeit. Herrn Dr. F. Fittler sage ich herzlichen Dank für stetige Anregung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit. Den anderen Kollegen der Abteilung danke ich für anregende Diskussionen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Ergebnisse	7
2.1. Anreicherung und Trennung der Alanin - spezifischen tRNAs aus Brauereihefe	7
2.1.1. Vorversuche zur Anreicherung der tRNA ^{Ala}	7
2.1.2. Chromatographie an BD - Cellulose - Säulen bei saurem pH und in Gegenwart von Harnstoff	8
2.1.3. Zuordnung der tRNA ^{Ala} - Gipfel zu tRNA ^{Ala} ₁ und tRNA ^{Ala} ₂	9
2.1.4. Anwendung der Chromatographie an BD-Cellu- lose bei saurem pH und in Gegenwart von Harnstoff zur Präparation der tRNA ^{Ala} ₁	14
2.2. Anreicherung und Trennung der Valin - spezifischen tRNAs aus E.coli	16
2.3. Isolierung der Halbmoleküle aus tRNA ^{Ala} ₁ und tRNA ^{Val} _{E.coli}	19
2.3.1. Darstellung der Halbmoleküle von tRNA ^{Ala} ₁ aus Hefe durch Spaltung der tRNA mit T ₁ - RNase	19
2.3.2. Darstellung der Halbmoleküle der tRNA ^{Val} ₁ aus E.coli durch enzymatische Spaltung der tRNA	24
2.3.3. Trennung der Fragmente	27
2.3.4. Zuordnung der Fragmente	28
2.4. Anreicherung der Aminoacyl - tRNA - Syn- thetasen	29

	Seite
2.4.1. Anreicherung der Alanyl - tRNA - Synthetase aus Brauereihefe	29
2.4.2. Anreicherung der Valyl - tRNA - Synthetase aus E.coli	29
2.5. Untersuchung der Komplexbildung und der Aminoacylierung von rekombinierten Halbmolekülen	32
2.5.1. Untersuchung des Komplexes von Halbmolekülen der tRNA ^{Ala} ₁ aus Hefe	32
2.5.2. Untersuchung des Komplexes von Halbmolekülen der tRNA ^{Val} ₁ aus E.coli	37
2.6. Untersuchung der Deacylierungsreaktionen der Alanyl - tRNA ^{Ala} ₁ durch Alanyl - tRNA-Synthetase	39
2.7. Versuche zum Nachweis und zur Aminoacylierung von heterologen Komplexen der Halbmoleküle der tRNA ^{Ala} ₁ aus Hefe und der tRNA ^{Val} ₁ aus E.coli	43
2.8. Untersuchung der Aminoacylierung von isolierten Fragmenten	50
2.8.1. Untersuchung der Aminoacylierung der CCA - Hälfte der tRNA ^{Ala} ₁ aus Hefe	52
2.8.2. Untersuchung der Aminoacylierung der pG - Hälfte der tRNA ^{Val} ₁ aus E.coli	59
3. Schlußwort	62
4. Beschreibung der Versuche	64
4.1. Materialien	64
4.2. Vorbereitung von Ionenaustauschern	65
4.3. Chromatographie von tRNAs an BD - Cellulose - Säulen	65

	Seite
4.4. Aminoacyl - tRNA - Synthetasen	66
4.5. Spaltungen	66
4.6. Diskelektrophorese	67
4.7. Vorinkubationsbedingungen und Amino-acylierungstests	67
5. Zusammenfassung der Ergebnisse	68
6. Literaturverzeichnis	71
7. Abkürzungsverzeichnis	77

1. Einleitung und Problemstellung

Spezifische Protein - Nukleinsäure Wechselwirkungen sind für den korrekten Ablauf wichtiger Vorgänge im Zellgeschehen von großer Bedeutung. Als Beispiele für solche Protein - Nukleinsäure Wechselwirkungen sei hier die Bildung von funktionellen Einheiten wie Ribosomen und Chromosomen genannt, wie auch an die regulatorische Rolle der Repressor - Operatorbindung erinnert (1 - 3). Die strukturellen Grundlagen solcher spezifischer Wechselwirkungen sind jedoch nicht ausreichend aufgeklärt. Sicher ist die Spezifität einer Reaktion sowohl von der Primärstruktur der Nukleinsäure, als auch von Merkmalen ihrer Tertiärstruktur abhängig.

Zum Studium von Protein - Nukleinsäure Wechselwirkungen bieten sich die tRNAs als Modellmoleküle an. Sie gehören zu den kleinsten und am besten untersuchten Nukleinsäuren. Man kennt die Primärstruktur von etwa 60 tRNAs. Inzwischen ist es auch gelungen, die Tertiärstruktur einer tRNA weitgehend aufzuklären (4, 5). Zur Untersuchung von Protein - Nukleinsäure Wechselwirkungen sind tRNAs zudem sehr vorteilhafte Modelle, da sie mit mehreren verschiedenen Proteinen in Wechselwirkung treten.

Schon im Verlauf der Biosynthese der tRNA treten Vorstufen mit einer Reihe von modifizierenden Enzymen in Wechselwirkung. Da sich alle "fertigen" tRNAs in einer kleeblattähn-

lichen Struktur anordnen lassen, und zudem fast ein Viertel aller Nukleotide in identischen Positionen verschiedener tRNAs gleich ist, sollten die Erkennungsregionen mehrerer tRNAs für diese Enzyme gleich oder ähnlich sein; man könnte von "unspezifischen" Erkennungsregionen sprechen.

Zu den modifizierenden Enzymen gehören beispielsweise die Nukleasen, die die Transkriptionsprodukte der tRNA - Gene zu kleineren tRNA - Molekülen zurechtschneiden (6 - 8). Wechselwirkungen mit solchen Enzymen sind in hohem Maße abhängig von der Fähigkeit der tRNA - Vorstufe, eine korrekte tRNA - Struktur anzunehmen (9). Weiter sollen in diesem Zusammenhang Enzyme erwähnt werden, die Nukleotide in bestimmten homologen Positionen der tRNA - Kette zu seltenen Nukleotiden umwandeln. Auch diese Enzyme dürften sich an der Raumstruktur der tRNAs orientieren. Über die Rolle der einzelnen modifizierenden Nukleotide weiß man noch wenig, doch kann man annehmen, daß die Modifizierungen die Raumstruktur der tRNA beeinflussen, die ihrerseits für eine spätere Wechselwirkung mit anderen Makromolekülen von Bedeutung ist. Insbesondere scheinen einige seltene Nukleotide für das Funktionieren der tRNA in der Proteinbiosynthese unerläßlich zu sein (10 - 14). Auch die CCA - Transferase, die die Anheftung des CCA - Endes an tRNAs katalysiert (15), gehört zu den unspezifischen Enzymen des tRNA-Stoffwechsels.

Die Erkennungsregionen für die Wechselwirkungen mit den bis-

her erwähnten Proteinen sollten für mehrere tRNA - Spezies gleich oder ähnlich sein. Andere Erkennungsregionen jedoch, die in verschiedenen tRNAs verschieden sein müssen, sind für die Synthetaseerkennung verantwortlich.

Die Wechselwirkung zwischen der tRNA und ihrer korrespondierenden Aminoacyl - tRNA - Synthetase ist der erste spezifitätsbestimmende Schritt in der Proteinbiosynthese. Er verläuft mit höchster Präzision. Jede tRNA akzeptiert in der Beladungsreaktion nur ihre entsprechende Aminosäure; der Einbau einer anderen natürlichen Aminosäure liegt unter der Nachweisgrenze, die mit 1 : 10 000 (16) angegeben wird. Welche der 20 Aminosäuren an die tRNA gebunden wird und ins Protein übertragen wird, wird von der Aminoacyl - tRNA - Synthetase entschieden, die nur an die ihr zugehörige tRNA bindet. Es ist jedoch noch wenig darüber bekannt, wie eine Aminoacyl - tRNA - Synthetase ihre spezifische tRNA erkennt.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben in den letzten Jahren versucht, die Regionen oder Strukturbestandteile der tRNA zu lokalisieren, die für die spezifische Wechselwirkung mit der Synthetase verantwortlich sind (17, 18). Im wesentlichen wurden dabei folgende experimentellen Methoden angewandt:

- a) Das tRNA - Molekül wurde chemisch modifiziert, und die Auswirkungen der Modifikation auf die Akzeptoraktivität untersucht.

- b) tRNAs, in denen bestimmte Nukleotide durch Mutation verändert waren, wurden untersucht.
- c) Die Primärstrukturen von isoakzeptierenden tRNAs wurden verglichen. Der Vergleich der identischen Regionen hat zu verschiedenen Deutungen über die Lokalisierung der spezifitätsbestimmenden Region geführt (19).
- d) Fragmente oder Fragmentkombinationen wurden auf ihre Akzeptoraktivität untersucht (20 - 23). Durch Kombination geeigneter Fragmente, die man in einer Art "Puzzlespiel" zu einer mehr oder weniger intakten tRNA zusammensetzte, erhoffte man sich Auskunft über die Regionen, die für die Erkennung der tRNA durch die Synthetase erforderlich bzw. entbehrlich sind.

Ergebnisse, die mit Hilfe der zuletzt erwähnten Methode erhalten werden, erlauben nur die Aufstellung eines Negativkatalogs (24), in dem solche Sequenzen aufgeführt sind, die nicht essentiell für die Synthetaseerkennung sind. Findet keine Aminoacylierung statt, so können keine Folgerungen bezüglich der Erkennungsregion gezogen werden, denn es ist nicht auszuschließen, daß der Molekülteil zwar die für die Synthetaseerkennung essentiellen Bereiche besitzt, jedoch in einer inaktiven Konformation vorliegt.

Eine engere Eingrenzung der Erkennungsregion für die Synthetase sollte möglich sein, wenn es gelänge, eine "synthetische" tRNA aus Fragmenten verschiedenakzeptierender tRNAs zu bilden, und diese hybride tRNA nur durch eine der Syn-

thetasen beladbar wäre. Durch die Ausbildung des Hybridmoleküls könnte das Fragment eine Konformation annehmen, die der in der intakten tRNA ähnlich ist. Der Vergleich der Primärstrukturen und der Kleeblattmodelle der bisher sequenzierten tRNAs läßt die Annahme zu, daß sich aus den Halbmolekülen der tRNA^{Ala}₁ aus Hefe und der tRNA^{Val}₁ aus E.coli Hybridmoleküle von einiger Stabilität bilden sollten. Eine Aminoacylierung eines solchen Komplexes sollte interessante Aufschlüsse über die Lokalisierung der Erkennungsregion auf einem der Halbmoleküle erlauben.

In der vorliegenden Doktorarbeit sollte nach Bedingungen gesucht werden, unter denen sich heterologe Komplexe aus den Halbmolekülen der oben erwähnten tRNAs bilden können. Weiter sollte geprüft werden, ob ein solcher Komplex durch eine oder beide Aminoacyl - tRNA - Synthetasen aminoacylierbar wäre. Als weitere Annäherung zur Auffindung der Synthetaseerkennungsregion sollten die isolierten CCA - Hälften von tRNA^{Ala}₁ aus Hefe und tRNA^{Val}₁ aus E.coli unter den Bedingungen auf ihre biologische Aktivität untersucht werden, die zu einer spezifischen Aminoacylierung von Halbmolekülen der tRNA^{Ser} und tRNA^{Phe} aus Hefe geführt hatten (25).

2. Ergebnisse

2.1. Anreicherung und Trennung der Alanin - spezifischen tRNAs aus Brauereihefe

2.1.1. Vorversuche zur Anreicherung der tRNA^{Ala}

Die erste brauchbare Methode zur Isolierung reiner tRNAs war die Gegenstromverteilung, (29 - 30), die auch heute noch, vor allem zur Isolierung größerer Mengen tRNA Anwendung findet. Bei Vorversuchen zur Anreicherung der tRNA^{Ala} durch eine Gegenstromverteilung des tertiären Butylamin - salzes von Hefe tRNA konnte jedoch keine Anreicherung und Auftrennung der Alanin - spezifischen tRNAs gefunden werden, wie sie von R. Thiebe erreicht wurde (31).

In den letzten Jahren wurden zur Isolierung reiner tRNAs immer häufiger chromatographische Methoden verwendet. Dabei hat sich neben anderen Trägermaterialien benzoylierte DEAE - Cellulose wegen der hohen Kapazität und Trennschärfe als besonders nützlich erwiesen (32). Maxwell et al. haben beobachtet (33), daß das Elutionsverhalten von tRNAs an BD - Cellulose durch exponierte aromatische Gruppen beeinflußt wird. Substituiert man die Aminogruppe der Aminoacyl - tRNA entweder mit einem Phenoxyacetylrest (34) oder einem Carboxyacetylrest (35), so wird in den meisten Fällen die derivatisierte tRNA erst mit dem Äthanolgradienten eluiert und kann so von unbeladenen und nicht deriva -

tisierten Molekülen abgetrennt.

In Vorversuchen wurde geprüft, ob sich diese Methode zur Anreicherung der Alanin - spezifischen tRNAs eignet. Bei diesen Versuchen wurde Hefe tRNA mit ^{14}C - Alanin beladen und mit dem Phenoxycetylesther von N - Hydroxysuccinimid umgesetzt. Bei der Chromatographie dieser derivatisierten Alanyl - tRNA wurden 70 Prozent der Radioaktivität im Äthanolgradienten eluiert. Zur Beladung größerer Mengen tRNA wurden die optimalen Bedingungen in Vorversuchen bestimmt. Da das Enzympräparat innerhalb kurzer Zeit an Alaninaktivität verlor (vgl. Kap. 2.4.1.), wurde das Rohenzym jeweils unmittelbar vor der präparativen Beladung hergestellt. Die Alanyl - tRNA wurde wie bei den Vorversuchen im analytischen Maßstab nach (34) derivatisiert, durch Chromatographie an BD - Cellulose - Säulen von den anderen tRNAs abgetrennt und gemäß Ref. 34 hydrolysiert. Bei der Bestimmung der Akzeptoraktivität zeigte sich jedoch, daß die Alanin - spezifischen tRNAs nur ca. 4 - 5 fach angereichert waren. Wir führen dies auf eine nicht ausreichende Reinigung des Enzympräparats zurück.

2.1.2. Chromatographie an BD - Cellulose - Säulen bei saurem pH und in Gegenwart von Harnstoff.

In der Zwischenzeit waren in unserem Labor von F. Fittler et al. (36) durch Variation verschiedener Parameter zwei neue Bedingungen für die Chromatographie an BD - Cellulose -

Säulen erarbeitet worden. Die Trennung auf BD - Cellulose - Säulen erfolgt auf Grund von ionischen und hydrophoben Wechselwirkungen der tRNA mit dem Trägermaterial. Durch Harnstoff werden sowohl die hydrophoben Wechselwirkungen, als auch die Tertiärstruktur der tRNA beeinflusst, durch Senken des pH - Wertes unter die pK - Werte der Aminogruppen von Cytidyl - und Adenylsäure wird die Ladung der Moleküle verändert. Chromatographiert man nun tRNAs an BD - Cellulose - Säulen bei 7 M Harnstoff und bei pH 3,0 (36), so werden die meisten tRNAs in einer anderen Reihenfolge eluiert, als an BD - Cellulose unter Standardbedingungen (32). Bei der Chromatographie von ^{14}C - Alanyl - tRNA mit unfractionierter tRNA beobachtet man 4 Gipfel der Radioaktivität (vgl. Abbildung 3 und Ref. 36). Die Trennung der isoakzeptierenden Arten war für tRNA^{Ala} bei der Chromatographie in Harnstoffpuffer besser, als ohne Harnstoff unter Standardbedingungen (32).

2.1.3. Zuordnung der tRNA^{Ala} - Gipfel zu $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ und $\text{tRNA}_2^{\text{Ala}}$

Bisher waren 2 tRNA^{Ala} - Spezies aus Hefe beschrieben worden (26 , 37). Es galt nun, $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ und $\text{tRNA}_2^{\text{Ala}}$ zu den verschiedenen Aktivitätsgipfeln für Alanin - spezifische tRNAs in Abbildung 3 zuzuordnen. Dazu wurde eine Fraktion, die durch Derivatisierung an Alanin - spezifischen tRNAs angereichert war (360 pMol Alanin / A_{260} - Einheit), auf einer BD - Cellulose - Säule unter Standardbedingungen chromatographiert. Dabei wird $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ im Gradienten nach $\text{tRNA}_2^{\text{Ala}}$

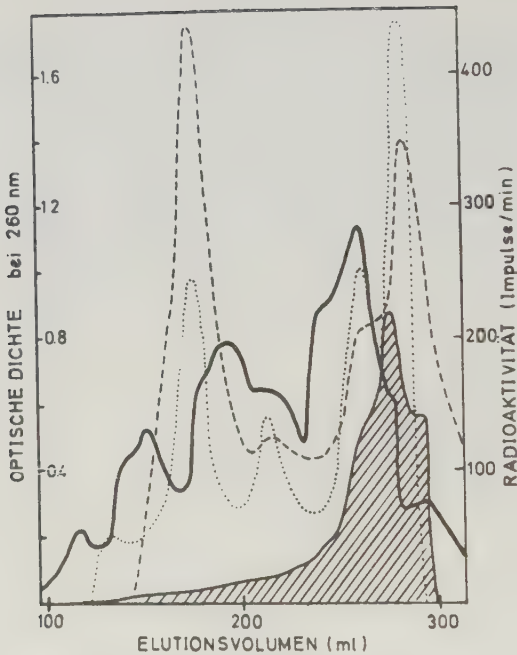


Abbildung 3: Chromatographie der tRNA^{Ala} -Spezies aus Brauereihefe an BD - Cellulose - Säulen bei 7 M Harnstoff und bei pH 3,0.

Fraktionen von $\text{tRNA}^{\text{Ala}}_1$ und $\text{tRNA}^{\text{Ala}}_2$, die durch Chromatographie an BD - Cellulose unter Standardbedingungen (37) erhalten wurden, wurden mit ^{14}C -Alanin beladen und mit unfractionierter Hefe tRNA cochromatographiert. Eine Superposition der Elutionsprofile von Alanyl- $\text{tRNA}^{\text{Ala}}_1$, Alanyl- $\text{tRNA}^{\text{Ala}}_2$ und Alanyl- $\text{tRNA}^{\text{Ala}}_{1,2}$ war möglich, da die Profile der optischen Dichte bei 260 nm übereinstimmten.

————— optische Dichte bei 260 nm
 $\text{tRNA}^{\text{Ala}}_{1,2}$
 - - - - - $\text{tRNA}^{\text{Ala}}_2$
 schraffierte Fläche $\text{tRNA}^{\text{Ala}}_1$

eluiert (37). Eine nach dieser Methode erhaltene Fraktion, die an $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ angereichert war, wurde dann mit ^{14}C - Alanin beladen und mit unfraktionierter Hefe tRNA bei pH 3,0 cochromatographiert. Es zeigte sich, daß unter diesen Bedingungen $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ im vierten Gipfel des Elutionsprofils enthalten ist (Abbildung 3). Auf die gleiche Art und Weise konnte gezeigt werden, daß $\text{tRNA}_2^{\text{Ala}}$ vorwiegend im ersten Gipfel des Elutionsprofils bei pH 3,0 enthalten ist (Abbildung 3). Zugleich ist zu erkennen, daß durch Chromatographie bei 7 M Harnstoff und bei pH 3,0 eine wesentlich bessere Trennung der Isoakzeptoren erreicht werden kann, als bei der Chromatographie unter Standardbedingungen, da die Fraktion von $\text{tRNA}_2^{\text{Ala}}$, die durch Chromatographie an BD - Cellulose unter Standardbedingungen erhalten wurde, noch einen beträchtlichen Teil an $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ enthielt.

Bei der Chromatographie in Gegenwart von Harnstoff und bei saurem pH wurden 4 Gipfel der Aktivität für tRNA^{Ala} gefunden. Die Anzahl der isoakzeptierenden Alanin - tRNAs kann durch 4 Alanin Codons bedingt sein. Auf Grund der Wobble - Hypothese (39) würden 2 tRNA^{Ala} - Spezies ausreichen, um die 4 Alanin - Codons GCU, GCC, GCA und GCG zu übersetzen. Ob es sich nun bei den bei der Chromatographie in Harnstoff bei pH 3,0 beobachteten zusätzlichen, nicht zu $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ oder $\text{tRNA}_2^{\text{Ala}}$ zuzuordnenden Aktivitätsgipfeln für tRNA^{Ala} (Abbildung 3) um weitere minore Spezies handelt, die sich in der Sequenz oder im Anticodon unterscheiden, oder um Aggregate oder verschiedene Konformationen der Alanin - spezifischen

tRNAs, wurde nicht weiter untersucht.

Abbildung 4: a) Chromatographie von tRNA aus Brauereihe - fe an einer BD - Cellulose - Säule (2,4 x 100 cm). Die tRNA wurde mit einem linearen Gradienten von Harnstoff und NaCl eluiert (4 M Harnstoff, 0,33 M NaCl - 8 M Harnstoff , 0,39 M NaCl, je 2,5 l, pH 3,0). Die Hauptmenge der tRNA wurde mit 1 M NaCl, 7 M Harnstoff, pH 3,0 eluiert, wie in der Abbildung angegeben.

_____ Extinktion bei 260 nm
----- tRNA^{Ala}

- b) Rechromatographie der in der Abbildung 4a angezeigten Fraktion auf einer BD - Cellulose - Säule (1,5 x 50 cm) mit einem linearen Gradienten (0,22 - 0,47 M NaCl, je 1 l in 7 M Harnstoff, pH 3,0).
- c) Rechromatographie der in Abbildung 4b angezeigten Fraktion auf einer BD - Cellulose - Säule (1 x 50 cm) mit einem linearen Gradienten (0,3 - 0,8 M NaCl, je 400 ml) in 0,01 M MgCl₂, 0,05 M Natriumacetat, pH 5,0. Die von der Säule eluierte tRNA zeigte erst nach dem Fällern mit Äthanol Akzeptoraktivität.

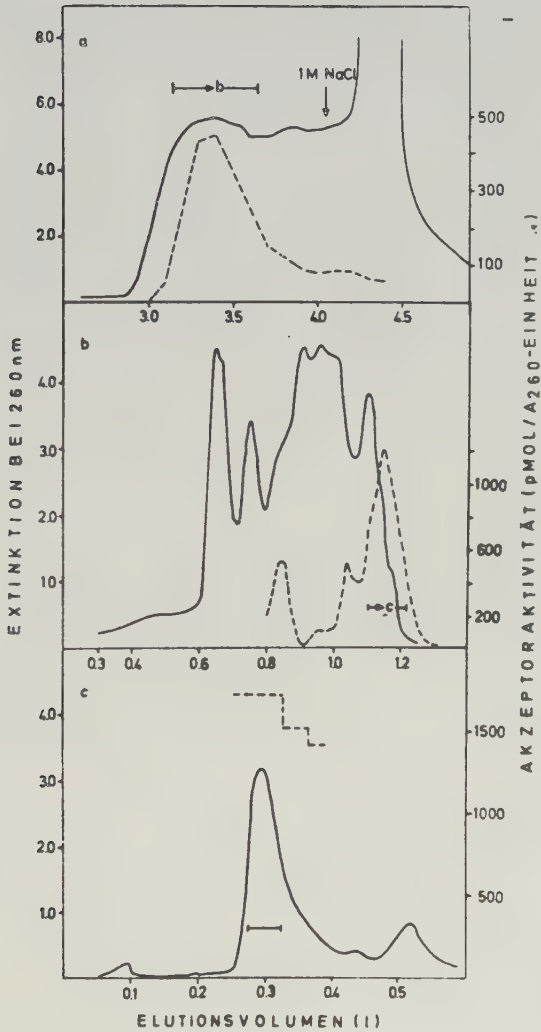


Abbildung 4: Isolierung der tRNA^{Ala}₁ aus Brauereihefe

2.1.4. Anwendung der Chromatographie an BD - Cellulose - Säulen bei saurem pH und in Gegenwart von Harnstoff zur Präparation von tRNA^{Ala}₁

Durch Kombination der verschiedenen Trennmethoden an BD - Cellulose - Säulen konnte die Isolierung der tRNA^{Ala}₁ gegenüber der früher beschriebenen (40) wesentlich vereinfacht werden und auch tRNA^{Ala}₂ besser abgetrennt werden. Die Reinigung erfolgte durch drei aufeinanderfolgende Chromatographieschritte an BD - Cellulose - Säulen durch Chromatographie unter verschiedenen Bedingungen (Abbildung 4).

- a) Anreicherung der Alanin - spezifischen tRNAs durch Chromatographie mit einem Harnstoffgradienten (36)
- b) Anreicherung und Trennung der tRNA^{Ala} - Spezies durch Chromatographie bei 7 M Harnstoff und bei pH 3,0 (36) und
- c) Rechromatographie der tRNA^{Ala}₁ unter Standardbedingungen (32 , .

Auf diese Art wurden insgesamt acht tRNA^{Ala}₁ - Präparationen durchgeführt. Die Akzeptoraktivität der so erhaltenen tRNA^{Ala}₁ war zwischen 1500 und 1750 pMol Alanin / A₂₆₀ - Einheit. Mengen und spezifische Aktivitäten in den einzelnen Schritten einer durchschnittlichen tRNA^{Ala}₁ - Isolierung sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die tRNA war nach der Chromatographie bei pH 3,0 teilweise inaktiviert, zeigte jedoch nach einer Chromatographie auf einer BD - Cellulose - Säule wieder die volle Akzeptoraktivität.

Tabelle 1: Bilanz der tRNA^{Ala}₁ - Isolierung

	tRNA (A ₂₆₀ -Einheiten)	tRNA ^{Ala} (pMol)	spezifische Akti- vität (pMol Ala - min/A ₂₆₀ -Einheit)
a) Chromatographie mit einem Harnstoffgra- dienten			
Start	18 000	1 180 000	60
angereicherte Fraktion	2 400	480 000	200
b) Chromatographie bei 7 M Harnstoff und bei pH 3,0			
Start	2 400	480 000	200
angereicherte Fraktion	350	203 000 (tRNA ^{Ala} ₁)	580
c) Rechromatographie bei pH 5,0			
Start	350	203 000	580
angereicherte Fraktion	180	330 000	1 700

Die Akzeptoraktivität wurde jeweils aus den mit Äthanol gefällten Fraktio-
nen bestimmt.

2.2. Anreicherung und Trennung der Valin - spezifischen tRNAs aus E.coli

tRNA^{Val}₁ aus E.coli wurde entweder nach der Methode von S. Nishimura (42) oder nach einer neu ausgearbeiteten Methode isoliert. Im letzteren Falle wurde tRNA^{Val}₁ durch Chromatographie auf einer BD - Cellulose - Säule bei pH 3,0 (Ref. 36 , Abbildung 4a) und Rechromatographie auf einer BD - Cellulose - Säule unter Standardbedingungen (Ref. 32 , Abbildung 4b) erhalten. Die Trennung der Isoakzeptoren fand im wesentlichen auf der 2. Säule statt.

Nach dieser Methode wurden insgesamt 13 tRNA^{Val}₁ - Aufarbeitungen ausgeführt. Bei 9 dieser Aufarbeitungen war die Akzeptoraktivität der tRNA^{Val}₁ zwischen 1100 und 1500 pMol Valin / A₂₆₀ - Einheit. Die Mengen und spezifischen Aktivitäten der tRNA^{Val}₁ - Isolierung sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Sowohl die Anreicherung der tRNA^{Val}₁, als auch die Ausbeuten an tRNA^{Val}₁ entsprechen den in Ref. 41 erreichten.

Bei vier der Aufarbeitungen wurde zum Harnstoffpuffer 0,01 M 2 - Mercaptoäthanol zum Schutz des 4 - Thio - Uridins in Position 69 zugegeben. Die Akzeptoraktivität der tRNA^{Val}₁ war etwas geringer, als nach Aufarbeitungen ohne Zusatz von 2 - Mercaptoäthanol (700 - 1100 pMol Valin / A₂₆₀ - Einheit). Wurde jedoch diese tRNA^{Val}₁ gespalten (wie in Kap. 2.3.2. beschrieben), die Halbmoleküle isoliert und unter den in Kap. 2.5.2. beschriebenen Bedingungen rekombiniert, so kann-

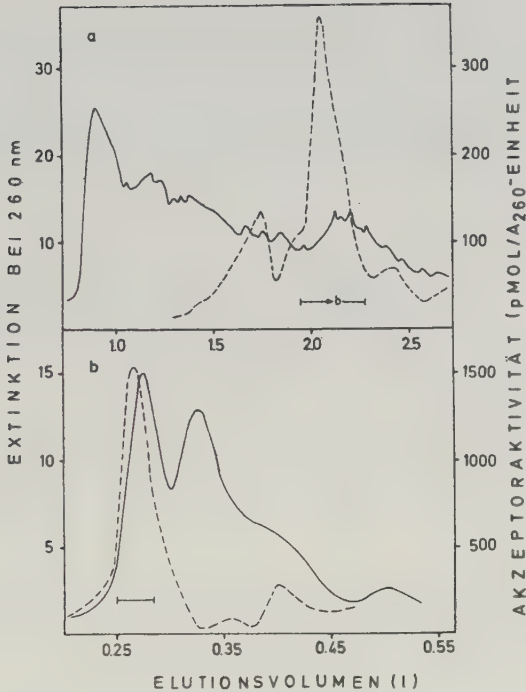


Abbildung 5: Isolierung der tRNA^{Val}₁ aus E.coli

- a) Chromatographie auf einer BD - Cellulose - Säule (3 x 50 cm) mit einem linearen Gradienten (0,22 - 0,47 M NaCl, je 3 l) in 7 M Harnstoff bei pH 3,0
- b) Rechromatographie der in Abbildung 5a angezeigten Fraktion auf einer BD - Cellulose - Säule (1 x 70 cm) mit einem linearen Gradienten (0,4 - 1,1 M NaCl, je 600 ml) in 0,01 M MgCl₂ , 0,05 M Natriumacetat, pH 5,0

———— Extinktion bei 260 nm
 - - - - - tRNA^{Val}

Tabelle 2: Bilanz der tRNA^{Val}₁ - Isolierung

	tRNA (A ₂₆₀ -Einheiten)	tRNA ^{Val} (pMol)	spez. Aktivi- tät (pMol Valin/ A ₂₆₀ -Einheit)
a) Chromatographie bei pH 3,0			
Start	29 720	2 312 216	77,8
angereicherte Fraktion	2 720	1 173 680	431,5
b) Rechromatographie bei pH 5,0			
Start	2 720	1 173 680	431,5
angereicherte Fraktion	380	472 340	1 234

Die Akzeptoraktivität wurde jeweils aus den mit Äthanol gefällten Fraktionen bestimmt.

te das Hältengemisch nicht mehr aminoacyliert werden.

Ein Vergleich der 4 - Thio - Uridin - Spektren der tRNAs, die mit und ohne Zusatz von 2 - Mercaptoäthanol hergestellt waren, zeigte eine um 70 - 80 Prozent verminderte Extinktion bei 335 nm (dem Extinktionsmaximum für 4 - Thio - Uridin) für die tRNA^{Val}₁, bei deren Präparation Mercaptoäthanol im Puffer enthalten war. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, daß 2 - Mercaptoäthanol bei pH 3,0 Veränderungen am 4 - Thio - Uridin bewirken kann, die Einfluß auf die Rekombination der Halbmoleküle nehmen können. Diese Annahmen wurden aber nicht weiter untersucht.

2.3. Isolierung der Halbmoleküle aus $\text{tRNA}_{\text{Hefe}}^{\text{Ala}_1}$ und $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{Val}_1}$

2.3.1. Darstellung der Halbmoleküle von $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ aus Hefe durch Spaltung der tRNA mit T_1 - RNase

Die Partialspaltung der $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ aus Hefe wurde bereits von R.W. Holley und Mitarbeitern beschrieben (Ref. 42 und 43). Sie erhielten durch Spaltung der $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ mit T_1 - RNase im Anticodon eine CCA - und eine pG - Hälfte. Es wurde daher zunächst versucht, die gemäß 2.1.4. isolierte $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ nach den in Ref. 42 beschriebenen Bedingungen in Halbmoleküle zu spalten. Bei den Vorversuchen unter Anwendung der Disk-elektrophorese zeigte sich jedoch, daß bei der Spaltung der $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$, die durch Chromatographie an BD - Cellulose - Säulen unter verschiedenen Bedingungen hergestellt worden war, Halbmoleküle nur in sehr geringem Ausmaß entstanden, statt dessen aber bevorzugt Fragmente in der Größe von $3/4$ und $1/4$ tRNAs gebildet wurden.

Es ist bekannt, daß z.B. tRNA^{Ser} und tRNA^{Phe} aus Hefe in verschiedenen Konformationen vorliegen können, die bei der Spaltung mit Ribonukleasen verschiedene Spaltmuster zeigen (44 , 45). So wurde die Möglichkeit in Erwägung gezogen, daß die gemäß 2.1.4. isolierte $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ eine andere Konformation haben könnte, als eine $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$, die nach Ref. 46 hergestellt worden war. Daher wurde, wiederum unter Anwendung der analytischen Diskelektrophorese untersucht, ob man $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ von der Konformation der vorliegenden Form (- sie

sei A genannt -) durch eine Vorinkubation in eine andere Konformation (B) überführen kann, aus der bei der Spaltung mit T_1 - RNase bevorzugt Halbmoleküle entstehen können.

Es zeigte sich, daß eine größere Menge an Halbmolekülen entstand, wenn die $tRNA_1^{Ala}$ der Konformation A für 5 Minuten in Acetattpuffer pH 6,5 bei 65° vorinkubiert wurde, und die Lösung dann langsam (innerhalb von 3 - 4 Stunden) im Wasserbad abgekühlt wurde. In Abbildung 7a ist der zeitliche Verlauf einer Partialspaltung von $tRNA_1^{Ala}$, die vorinkubiert worden war, nach den in Ref. 42 beschriebenen Bedingungen zu verfolgen. Die Ausbeute an Halbmolekülen war bei der Spaltung der vorbehandelten tRNA sehr viel höher, als bei der Spaltung der unbehandelten tRNA, doch noch immer war die Bildung eines Fragments von der Größe einer $3/4$ tRNA bevorzugt (Abbildung 7a).

Durch systematische Variation der Konzentrationen von T_1 - RNase und $MgCl_2$ und des pH - Wertes wurde nach noch besseren Inkubationsbedingungen für die Partialhydrolyse von $tRNA_1^{Ala}$ gesucht. Die Ausbeute an Halbmolekülen war am größten, wenn die in der Legende zu Abbildung 6 beschriebenen Bedingungen eingehalten wurden. Abbildung 6b und 7b zeigen, daß die $tRNA_1^{Ala}$ unter diesen Bedingungen fast ausschließlich im Anticodon zu Halbmolekülen gespalten wird.

Das Verhalten von vorbehandelter und nicht vorbehandelter

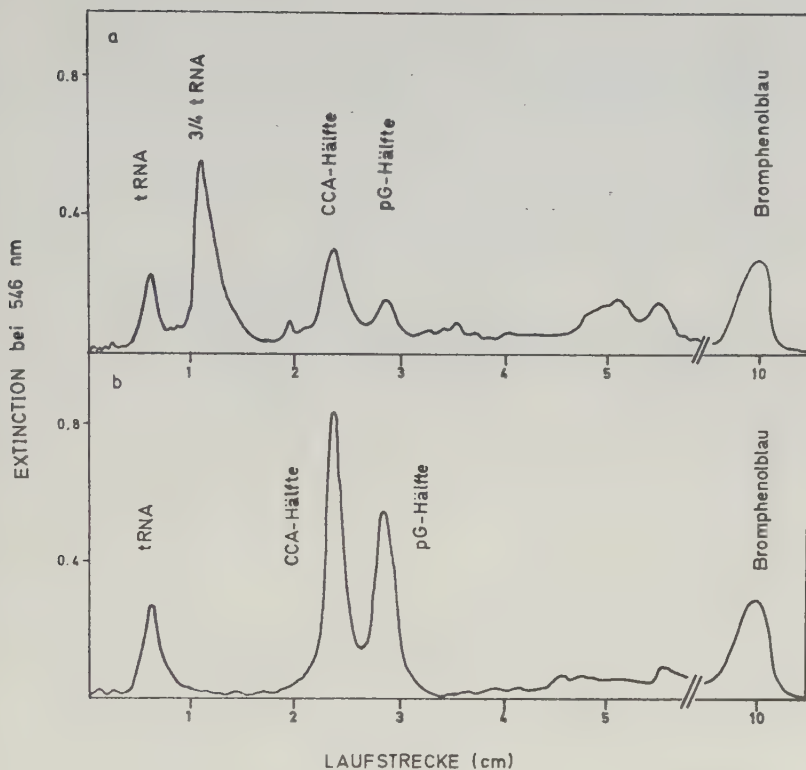


Abbildung 6: Partialsplaltung von nicht vorinkubierter $tRNA_1^{Ala}$ (Konformation A, Abbildung 6a) und vorinkubierter $tRNA_1^{Ala}$ (Konformation B, Abbildung 6b) mit T_1 -RNase.

Densitogramme der Spaltmuster nach 60 Minuten Inkubation. 0,75 A_{260} - Einheiten $tRNA_1^{Ala}$ wurden in 100 μ l 0,1 M Kaliumacetat pH 6,0, 0,02 M $MgCl_2$ mit 250 mEinheiten T_1 - RNase bei 0° inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden aliquote Teile entnommen und jeweils 0,1 A_{260} - Einheiten auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

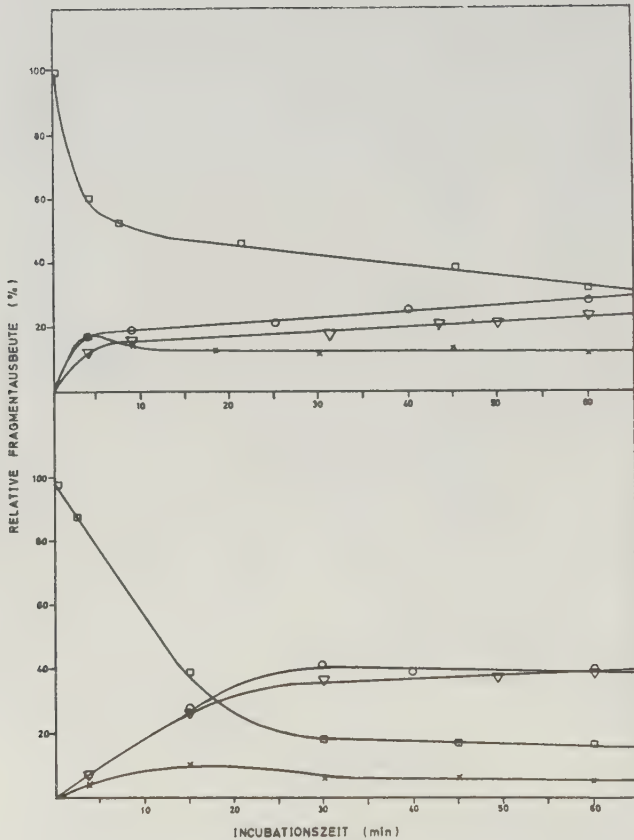


Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf der Partialspaltung von $tRNA_{1}^{Ala}$ mit T_1 - RNase.

In verschiedenen Densitogrammen wurden die Flächen unter den Gipfeln bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Die Fläche unter dem Gipfel der tRNA im Densitogramm eines vor Start der Reaktion entnommenen aliquoten Teil wurde gleich 100 % gesetzt.

- a) Zeitlicher Verlauf der Partialspaltung von tRNA^{Ala}₁ mit T₁ - RNase gemäß den bei Penswick (Ref. 42) beschriebenen Bedingungen.
- b) Zeitlicher Verlauf der Partialspaltung von tRNA^{Ala}₁ entsprechend den in der Legende zu Abbildung 6 beschriebenen Bedingungen.

■■■■■■ ungespaltene tRNA
 ooooooooo CCA - Hälften
 ▼▼▼▼▼▼ pG - Hälften
 xxxxxxxx Fragment in der Größe einer 3/4 tRNA

tRNA^{Ala}₁ bei der Spaltung mit T₁ - RNase wurde unter den zur Bildung von Halbmolekülen optimalen Bedingungen verglichen. Es zeigte sich, daß sich durch die oben beschriebene Vorinkubation der tRNA^{Ala}₁ Veränderungen der Konformation ergeben, durch die das Anticodon der vorbehandelten tRNA (Form B, Abbildung 6b) wesentlich mehr exponiert ist, als das der nicht vorbehandelten tRNA (Form A, Abbildung 6a).

Bei den Vorversuchen im analytischen Maßstab wurde die Reaktion durch Zugabe einer Lösung von 50 % Sucrose, 10 mM ZnSO₄, 7 M Harnstoff und Bromphenolblau als Marker für die Gelelektrophorese gestoppt.

Um die Halbmoleküle im präparativen Maßstab zu isolieren, wurden 225 A₂₆₀ - Einheiten tRNA^{Ala}₁ aus Hefe wie in der Legende zu Abbildung 6 beschrieben mit T₁ - RNase gespalten.

Zur Beendigung der Reaktion wurde das Gemisch aus ganzer tRNA und Hälften mit dem zweifachen Volumen Äthanol gefällt. Die Trennung der Fragmente erfolgte, wie nachfolgend in Kap. 2.3.3. beschrieben.

2.3.2. Darstellung der Halbmoleküle von $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ aus E.coli durch enzymatische Spaltung der tRNA

Zunächst wurde, wiederum mit Hilfe der analytischen Disk-elektrophorese, die Möglichkeit untersucht, Halbmoleküle aus $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ durch Spaltung mit verfügbaren Enzymen zu erhalten.

Bei der Spaltung von $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ mit T_2 - RNase unter Bedingungen, wie sie für tRNA^{Ser} beschrieben sind (45), entstanden nur kleine Mengen an Halbmolekülen, wohingegen bevorzugt ein Fragment in der Größe einer $3/4$ tRNA gebildet wurde.

Relativ gute Ausbeuten an Hälften konnten durch eine Partialspaltung der $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ mit Pankreas - RNase unter definierten Bedingungen (vgl. Methodenteil) erhalten werden. Ein Vergleich der Abnahme des ^{14}C - Valin - Einbaus in das Spaltungsgemisch mit der Abnahme der tRNA zu verschiedenen Zeiten der Spaltung bestätigte jedoch die Annahme, daß durch die RNase aus Rinderpankreas auch das terminale CCA abgespalten wurde.

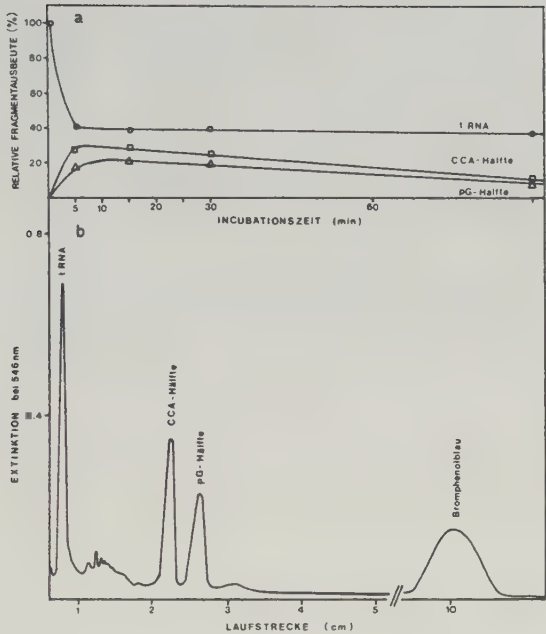


Abbildung 8: Partialspaltung von $tRNA^{Val}_1$ mit der RNase aus *B. Amyloliquefaciens*

a) Zeitlicher Verlauf der Partialspaltung.

Eine Serie von Densitogrammen wurde wie in der Legende zu Abbildung 7 beschrieben ausgewertet. Die Inkubationsbedingungen entsprechen denen in Abbildung 8b.

- ungespaltene tRNA
- CCA - Hälfte
- ▲▲▲▲▲▲ pG - Hälfte

b) Densitogramm einer analytischen diskelektrophoretischen Trennung eines aliquoten Teils der Spaltung von 140 A_{260} -Einheiten $tRNA^{Val}_1$ in 20 ml Puffer (0,077 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,3, 0,02 M $MgCl_2$) wurden mit 70 Einheiten RNase aus *B. Amyloliquefaciens* (47) für 9 Minuten bei 20° inkubiert.

Daher wurde die extrazelluläre Nuklease aus *B. Amylolyquefaciens* (47) isoliert, und die $\text{tRNA}_{1}^{\text{Val}}$ durch Partial - hydrolyse mit dieser Nuklease in Hälften gespalten, wie in Ref. 48 beschrieben. In Abbildung 8a ist der zeitliche Verlauf dieser Partialspaltung von $\text{tRNA}_{1}^{\text{Val}}$ zu verfolgen. Es zeigte sich, daß die $\text{tRNA}_{1}^{\text{Val}}$ auch bei längeren Inkubationszeiten nicht vollständig gespalten wurde. Auch konnte durch eine Vorinkubation, wie sie in Kap. 2.3.1. für $\text{tRNA}_{1}^{\text{Ala}}$ beschrieben ist, kein größerer Anteil der $\text{tRNA}_{1}^{\text{Val}}$ in eine für die Spaltung im Anticodon günstigere Konformation umgewandelt werden. Es konnte auch durch Variation der Enzymkonzentration kein größerer Anteil der $\text{tRNA}_{1}^{\text{Val}}$ gespalten werden, jedoch wurden bei erhöhter Enzymkonzentration oder bei längeren Inkubationszeiten die Halbmoleküle zu kleineren Fragmenten abgebaut. Abbildung 8b veranschaulicht das Mengenverhältnis von Halbmolekülen und ganzer tRNA unter den schließlich gewählten optimalen Bedingungen (in der Legende zu Abbildung 8 beschrieben).

Um die Fragmente in präparativem Maßstab zu isolieren, wurden 140 A_{260} - Einheiten $\text{tRNA}_{1}^{\text{Val}}$ mit der RNase aus *B. Amylolyquefaciens* gespalten, wie in der Legende zu Abbildung 8b beschrieben, und die Reaktion durch wiederholte Behandlung mit Phenol gestoppt. Das Gemisch aus Halbmolekülen und ganzer tRNA wurde mit Äthanol gefällt. Die Trennung der Fragmente erfolgte, wie nachfolgend in Kap. 2.3.3. beschrieben.

2.3.3. Trennung der Fragmente

Die Fragmente wurden getrennt und isoliert durch präparative Gelelektrophorese, wie bei Philippsen und Zachau (Ref. 56) beschrieben.

Für die in Kapitel 1 besprochene Problematik der Versuche war es unbedingt erforderlich, daß die Halbmoleküle bis unterhalb der Nachweisgrenze von 1 Prozent frei von Verunreinigungen durch das komplementäre Halbmolekül waren. Schon geringe Beimengungen des komplementären Halbmoleküls könnten zur Ausbildung eines homologen Komplexes beitragen, der acylierbar ist, und somit eine Beladung des isolierten Halbmoleküls vortäuschen würde. Zudem würde die Ausbildung eines homologen Komplexes die weniger begünstigte Bildung eines heterologen Hybridmoleküls verhindern.

Da sich die Halbmoleküle in ihrer Kettenlänge nur um 7 Nukleotide (Halbmoleküle aus $\text{tRNA}_{\text{Ala}}^{\text{Ala}}$) bzw. 8 Nukleotide (Halbmoleküle aus $\text{tRNA}_{\text{Val}}^{\text{Val}}$) unterscheiden, war ihre vollständige Trennung durch eine einfache Gelelektrophorese nicht möglich. Die Halbmoleküle enthielten noch 5 - 10 Prozent des komplementären Halbmoleküls als Verunreinigung.

Diese Verunreinigung konnte jedoch in einem 2. Lauf der präparativen Gelelektrophorese vollständig abgetrennt werden. Dazu wurde der Gelausschnitt mit dem jeweiligen noch verunreinigten Halbmolekül homogenisiert und direkt mit

dem Sammelgel über ein Trenngel polymerisiert, wie bei W. Wübbeler (Ref. 25) beschrieben ist. Da bei dieser Methode die Fragmente nach der ersten Elektrophorese nicht aus dem Gel isoliert werden mußten, war die Ausbeute bei guter Reinigung hoch. In keinem der Fragmente waren mit Hilfe der analytischen Diskelektrophorese noch Verunreinigungen nachzuweisen.

2.3.4. Zuordnung der Fragmente

Die Halbmoleküle wurden zugeordnet auf Grund ihrer relativen Wanderungsgeschwindigkeit in der analytischen Disk-elektrophorese. Auf Grund der Primärstrukturen der tRNAs (26, 28) wurde das größere Fragment als CCA - Hälfte definiert. Diese Zuordnung wurde durch den Befund bestätigt, daß die isolierte CCA - Hälfte von sowohl tRNA^{Ala}₁, als auch von tRNA^{Val}₁ mit der Exonuklease aus Schlangengift wesentlich schneller abgebaut wurde, als die entsprechende isolierte pG - Hälfte.

Die pG - Hälfte von tRNA^{Val}₁ konnte zusätzlich identifiziert werden, weil sie 4 - Thio - Uridin enthält (49), das ein Extinktionsmaximum bei 335 nm hat. Durch Bestimmung des Verhältnisses der Extinktion bei 260 und 335 nm wurde bestätigt, daß das kleinere Fragment aus der tRNA^{Val}₁ die pG - Hälfte war.

2.4. Anreicherung der Aminoacyl - tRNA - Synthetasen

2.4.1. Anreicherung der Alanyl - tRNA - Synthetase aus Brauereihefe

Es ist bekannt, daß Alanyl - tRNA - Synthetase aus Hefe schwer zu reinigen ist und mit zunehmendem Reinigungs - grad an Stabilität verliert (50). Auf eine Anreicherung wurde daher weitgehend verzichtet. Nur für diejenigen Experimente, für die eine hohe Gesamtaktivität des Enzyms erforderlich war (Kap. 2.6. und 2.8.1.) wurde versucht, eine höhere Anreicherung der Synthetase zu erreichen.

Die Rohfraktion wurde nach einer in unserem Labor ausgearbeiteten Methode hergestellt (51). Das Enzym wurde mit Ammoniumsulfat fraktioniert und die Nukleinsäuren wurden durch Chromatographie an DEAE - Cellulose (vgl. Methodenteil) entfernt.

Das Enzympräparat hatte, abhängig von der Aufarbeitung , eine spezifische Aktivität (52) von 0,5 - 1,5 mEinheiten/ A_{280} - Einheit und ein Verhältnis von A_{280}/A_{260} - Einheiten von 1,4 - 1,58.

2.4.2. Anreicherung der Valyl - tRNA - Synthetase aus E.coli

Valyl - tRNA - Synthetase aus E.coli wurde durch Kombination der Verfahren von Yaniv und Gros (Ref. 53) und Yarus

und Berg (Ref. 54) partiell gereinigt. Die Zellen wurden aufgeschlossen wie in Ref. 51 beschrieben und in Phosphatpuffer pH 7,2 aufgenommen. Nach Zentrifugation bei 35 000g wurde der Überstand durch Ammoniumsulfat - zugabe fraktioniert. Die Fraktion zwischen 45 und 65 % Ammoniumsulfatsättigung wurde weitergereinigt durch Chromatographie auf einer DEAE - Cellulose - Säule (vgl. Methodenteil) und nachfolgender Chromatographie auf einer DEAE - Sephadex - Säule (vgl. Abbildung 9). Die in der Abbildung angezeigten Fraktionen wurden gesammelt und durch Dialyse gegen den Puffer der DEAE - Sephadex - Säule, der zusätzlich 15 % Polyäthylenglycol enthielt, konzentriert.

Tabelle 3: Spezifische Aktivität und das A_{280}/A_{260} - Verhältnis in verschiedenen Anreicherungsstufen bei einer Präparation von Valyl - tRNA - Synthetase aus E.coli

Anreicherungsstufe des Enzyms	A_{280}/A_{260}	mEinheiten/ A_{280} -Einheit
35 000 g Überstand	0,586	0,5
Ammoniumsulfatfällung	0,894	0,7
DEAE - Cellulose - Chromatographie	1,45	6,0
DEAE - Sephadex - Chromatographie	1,59	37

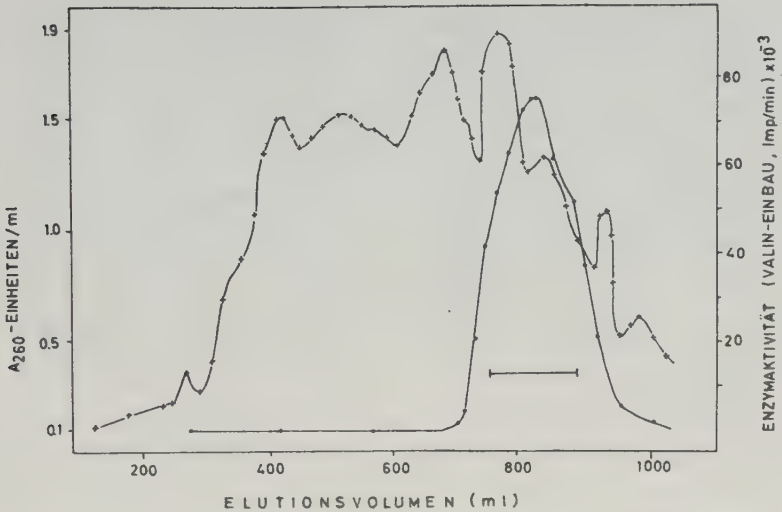


Abbildung 9: Reinigung der Valyl - tRNA - Synthetase aus E.coli auf einer DEAE - Sephadex - Säule

Das Protein, das von einer DEAE - Cellulose - Säule eluiert worden war, wurde gegen Puffer (0,01 M Tris-HCl, 0,006 M 2-Mercaptoäthanol und 0,1 mM EDTA, pH 7,5) dialysiert und dann auf einer DEAE - Sephadex - A 50 Säule (3,0 x 24 cm) mit einem NaCl - Gradienten (0,1 - 0,4 M NaCl, je 600 ml) in Puffer (0,01 M Tris-HCl, 0,006 M 2-Mercaptoäthanol und 0,1 M EDTA, pH 7,5) chromatographiert .

Nach Zugabe des gleichen Volumens Glycerin wurde das Enzympräparat bei -20° aufbewahrt und verlor unter diesen Bedingungen für zumindest ein halbes Jahr kaum Aktivität. Die gereinigte Valyl - tRNA - Synthetase hatte, abhängig von der Aufarbeitung, eine spezifische Aktivität (52)

von 30 - 40 mEinheiten / A_{280} - Einheit und ein Verhältnis der A_{280}/A_{260} - Einheiten von 1,58 - 1,61 (vgl. Tabelle 3).

2.5. Untersuchung der Komplexbildung und der Aminoacylierung von rekombinierten Halbmolekülen

2.5.1. Untersuchung des Komplexes von Halbmolekülen der $tRNA_{1}^{Ala}$ aus Hefe

J.R. Penswick berichtete bereits (42), daß das Gemisch der Halbmoleküle aus $tRNA_{1}^{Ala}$ nach der Spaltung der tRNA im Anticodon noch aminoacylierbar war. Wurden die Hälften jedoch getrennt und dann wieder zusammengegeben, dann konnten sie nicht mehr mit Alanin beladen werden.

Der Aminoacylierung muß eine Reassoziaton der Fragmente vorangehen, die von verschiedenen Parametern, wie Zeit, Temperatur, Salzbedingungen etc. abhängig ist. Es ist bekannt, daß die Halbmoleküle aus einigen tRNAs, z.B. $tRNA_{Hefe}^{Ser}$ (22), $tRNA_{Hefe}^{Val}$ (55) und $tRNA_{Hefe}^{Phe}$ (23) sehr leicht homologe Komplexe bilden, dagegen aber Halbmoleküle aus anderen tRNAs, z.B. $tRNA_{E.coli}^{Val}$ (48) nur sehr schwer re-kombinieren.

Es wurde zunächst versucht, einen Komplex aus Halbmolekülen von $tRNA_{1}^{Ala}$ unter den Bedingungen zu bilden, unter denen die Halbmoleküle von $tRNA^{Phe}$ und $tRNA^{Ser}$ vollkommen

rekombinierten. Das Gemisch von Halbmolekülen aus tRNA^{Ala}₁ konnte unter keiner dieser Bedingungen mit Alanin beladen werden. Dieser experimentelle Befund kann entweder damit erklärt werden, daß die Halbmoleküle keinen homologen Komplex gebildet hatten, oder aber, daß der gebildete Komplex in einer für die Synthetase nicht zu erkennenden Konformation vorlag. Deshalb wurde mit Hilfe der Diskelektrophorese unter nicht - dissoziierenden Bedingungen (21) untersucht, ob sich die Halbmoleküle überhaupt zu einem Komplex zusammengelagert hatten. Es zeigte sich, daß die Fragmente unter diesen Bedingungen keinen Komplex bildeten, jedoch teilweise mit sich selbst assoziiert waren. Diese Bildung von Dimeren wird bei der Betrachtung der Primärstruktur der Halbmoleküle von tRNA^{Ala}₁ verständlich, denn die Ausbildung von intermolekularen Basenpaaren ist möglich. Zudem sollten die Halbmoleküle auf Grund ihrer Sequenz eine stabile Sekundärstruktur durch intramolekulare Basenpaarung annehmen können (42). Die Raumstruktur der Fragmente in der dimeren und in der durch intramolekulare Basenpaarung entstandenen Form unterscheidet sich deutlich von der Konformation, die die beiden Halbmoleküle als Bestandteile der ganzen tRNA haben würden.

Eine ähnlich stabile Sekundärstruktur von Fragmenten, bei der die Möglichkeit zur Ausbildung von Basenpaaren in den beiden isolierten Halbmolekülen fast ebenso groß ist, wie in der intakten tRNA wird auch für die Hälften der tRNA^{Val}₁

aus E.coli diskutiert (28). Die inkompetenten, d.h. zur Komplexbildung nicht befähigten Fragmente der $tRNA_1^{Val}$ können durch kurzzeitiges Erhitzen auf hohe Temperaturen (65 - 85°) und sehr langsames Abkühlen, oder auch durch eine 20 - stündige Vorinkubation bei 37° in eine zur Komplexbildung kompetente Form überführt werden und einen homologen Komplex ausbilden (48).

Zur Bildung eines Komplexes aus Halbmolekülen der $tRNA_1^{Ala}$ wurden daher die Fragmente unter den Bedingungen vorinkubiert, die zur Rekombination der $tRNA_1^{Val}$ aus E.coli geführt hatten. Das Ausmaß der Komplexbildung wurde wiederum mit Hilfe der analytischen Diskelektrophorese unter nicht - dissoziierenden Bedingungen untersucht. Dabei zeigte sich, daß auch die Ausbildung eines Komplexes von Halbmolekülen der $tRNA_1^{Ala}$ in gleicher Weise von den Temperatur - und Pufferbedingungen abhängig war, wie es für die Hälften von $tRNA_1^{Val}$ bereits beschrieben ist (48). Zudem war die Komplexbildung vom Mischungsverhältnis der Komponenten abhängig. Beide Halbmoleküle, sowohl die CCA - Hälfte aus $tRNA_1^{Ala}$, als auch die pG - Hälfte, konnten erst bei fünffachem Überschuß des komplementären Halbmoleküls vollständig in den Komplex überführt werden.

Zur Kontrolle wurden die Halbmoleküle auch einzeln in denjenigen Konzentrationen , in denen sie zur Komplexbildung eingesetzt wurden, vorinkubiert. Es zeigte sich, daß auch unter diesen Bedingungen die Halbmoleküle der $tRNA_1^{Ala}$ (ins-

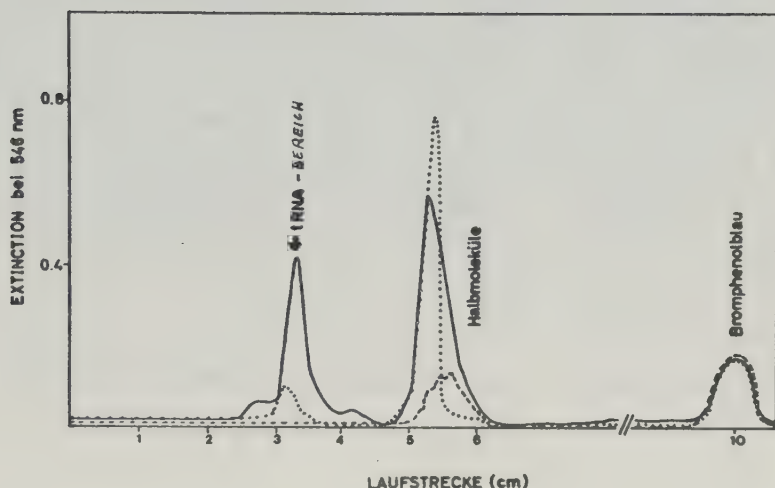


Abbildung 10: Superposition des Densitogramms einer Mischung der pG - Hälfte und der CCA - Hälfte der $\text{tRNA}_{1}^{\text{Ala}}$ im Verhältnis 1:5 mit den Densitogrammen der einzelnen Komponenten in den gleichen Konzentrationen.

Alle Proben waren wie in Ref. 48 beschrieben vorinkubiert worden. Die Polyacrylamidgel Elektrophorese wurde unter nicht - dissoziierenden Bedingungen durchgeführt.

- Gemisch der Halbmoleküle
- CCA - Hälfte der $\text{tRNA}_{1}^{\text{Ala}}$
- pG - Hälfte von $\text{tRNA}_{1}^{\text{Ala}}$

besondere ist dies zu erkennen, wenn sie in höheren Konzentrationen eingesetzt werden, (vgl. Abbildung 10 -) zu einem bestimmten Prozentsatz als Dimere vorlagen. Die Prozentangaben in Abbildung 11a wurden durch quantitative Auswertung der Densitogramme der analytischen Gelelektrophoresen unter nicht - dissoziierenden Bedingungen bestimmt. Die Mengen an Dimeren, die die entsprechenden Halbmoleküle unter den gleichen Bedingungen bildeten, waren in Kontrollversuchen bestimmt worden und bei diesen Berechnungen subtrahiert worden. Wegen der Ungenauigkeiten, mit denen Auswertungen von Densitogrammen naturgemäß behaftet sind, können aus diese Art und Weise nur Abschätzungen für das Ausmaß der Komplexbildung erhalten werden.

Der Komplex aus Hälften der $\text{tRNA}_{\text{Ala}}^{\text{Ala}}$ konnte vollständig mit Alanin beladen werden, wohingegen die Halbmoleküle allein unter den gleichen Bedingungen keinerlei Akzeptoraktivität hatten. Abbildung 11a zeigt die Abhängigkeit der Akzeptoraktivität und das Ausmaß der Komplexbildung der pG - Hälfte von $\text{tRNA}_{\text{Ala}}^{\text{Ala}}$ mit der CCA - Hälfte bei verschiedenen Mischungsverhältnissen der Hälften. Es ist zu sehen, daß der Grad der Aminoacylierung und der der Komplexbildung gut übereinstimmten. Eine Titration der CCA - Hälfte der $\text{tRNA}_{\text{Ala}}^{\text{Ala}}$ mit der pG - Hälfte brachte das gleiche Ergebnis.

2.5.2. Untersuchung des Komplexes von Halbmolekülen der $\text{tRNA}_{\text{Val}}^{\text{Val}}$ aus E.coli

Die Rekombination der Halbmoleküle der $\text{tRNA}_{\text{Val}}^{\text{Val}}$ aus E.coli wurde bereits von S. Nishimura et al. (48) untersucht. Diese Versuche konnten reproduziert werden. Die Kombination aus Halbmolekülen der $\text{tRNA}_{\text{Val}}^{\text{Val}}$ konnte im Vergleich zu in gleicher Weise vorinkubierter intakter $\text{tRNA}_{\text{Val}}^{\text{Val}}$ zu 80 - 100 Prozent mit Valin beladen werden, wohingegen die analog behandelten Halbmoleküle keinerlei Akzeptoraktivität hatten. Es zeigte sich jedoch, daß durch die lang - dauernde Vorinkubation unter den in Ref. 48 beschriebenen Bedingungen auch die Akzeptoraktivität der $\text{tRNA}_{\text{Val}}^{\text{Val}}$ selbst wesentlich abnahm. Die tRNA hatte nach der Vorinkubation nur noch 60 - 70 Prozent der Aktivität.

Wie für die Hälften aus $\text{tRNA}_{\text{Ala}}^{\text{Ala}}$ wurde auch für die Halbmoleküle der $\text{tRNA}_{\text{Val}}^{\text{Val}}$ zusätzlich zur Akzeptoraktivität auch das Ausmaß der Komplexbildung bei verschiedenen Mischungsverhältnissen der Halbmoleküle mit Hilfe der analytischen Diskelektrophorese unter nicht - dissoziierenden Bedingungen bestimmt. Bei den Kontrollversuchen, bei denen die Halbmoleküle einzeln in den gleichen Konzentrationen wie zur Komplexbildung eingesetzt wurden, zeigte sich, daß die Hälften der $\text{tRNA}_{\text{Val}}^{\text{Val}}$ zu einem weit höheren Maß zur Dimerisierung neigen, als die Halbmoleküle aus $\text{tRNA}_{\text{Ala}}^{\text{Ala}}$.

Das Ausmaß der Komplexbildung, wie es in Abbildung 11b an-

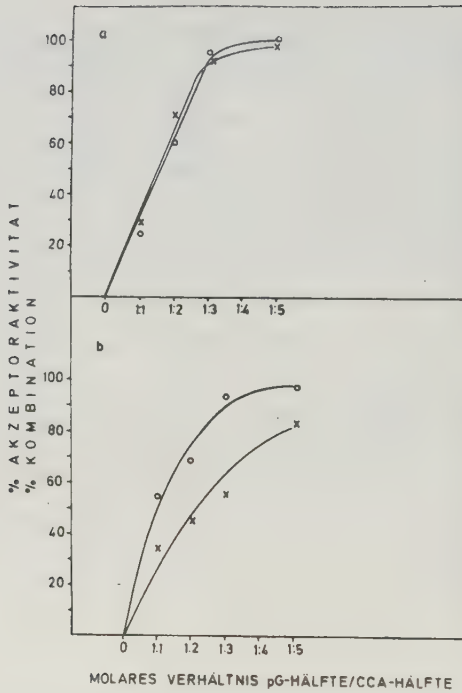


Abbildung 11: Vergleich der Akzeptoraktivität und der Assoziation von homologen Mischungen von Halbmolekülen bei verschiedenen Mischungsverhältnissen.

- a) Mischungen von Halbmolekülen der $tRNA_1^{Ala}$
- xxxxx % Akzeptoraktivität (pMol Alanin/ pMol pG - Hälfte), bezogen auf analog vorinkubierte $tRNA_1^{Ala}$. (100 % = 1200 pMol Alanin/ A_{260} - Einheit).
- ooooo % Komplexbildung der pG - Hälfte, bestimmt durch quantitative Auswertung von analytischen Gelelektrophoresen unter nicht - dissoziierenden Bedingungen (21). Beiträge, die

Dimere zu den Banden im tRNA - Bereich lieferten, waren dabei subtrahiert worden.

- b) Mischungen von Halbmolekülen der tRNA^{Val}₁
- xxxxx % Akzeptoraktivität (pMol Valin / pMol pG - Hälfte), bezogen auf die vorinkubierte tRNA^{Val}₁. (100 % = 740 pMol Valin / pMol A₂₆₀-Einheit).
- ooooo % Komplexbildung, bestimmt wie in der Legende zu Abbildung 11a beschrieben.

gegeben ist, wurde wiederum durch quantitative Auswertung der Densitogramme der analytischen Gelelektrophoresen unter nicht - dissoziierenden Bedingungen nach Abzug aller Kontrollen berechnet. Aus Abbildung 11b ist zu ersehen, daß das Ausmaß der Komplexbildung und der Grad der Aminoacylierung gut übereinstimmen.

2.6. Untersuchung der Deacylierungsreaktionen der Alanyl - tRNA^{Ala}₁ durch Alanyl - tRNA - Synthetase aus Hefe

Das Ausmaß der Aminoacylierung ist in vielen Fällen abhängig von experimentellen Bedingungen, wie Enzymkonzentrationen und Ionenstärken. Untersuchungen von Bonnet und Ebel (58) zeigen, daß Anomalien bei der Aminoacylierung der tRNA^{Val} aus Hefe erklärt werden können durch die Existenz von zwei Konkurrenzreaktionen, nämlich der spontanen De-

acylierung von Valyl - tRNA^{Val} und der durch die Synthetase katalysierten Deacylierung von Valyl - tRNA^{Val}.

Wie aus Untersuchungen in Gegenwart von Spermidin und Magnesium, wie auch bei der Untersuchung der enzymatischen Deacylierung von Phe - tRNA^{Phe}_{-Y} oder von Phe - tRNA^{Phe}, die im Anticodon gespalten ist, hervorgeht (59), ist die enzymatische Deacylierungsreaktion in beträchtlichem Maße von der Raumstruktur der tRNA abhängig. Die Esterbindung zwischen tRNA und Aminosäure wird in Gegenwart der Synthetase labilisiert, wenn die tRNA in der "richtigen" Konformation vorliegt. Ist die Struktur jedoch etwas verändert, wie z.B. bei im Anticodon gespaltenen Phe - tRNA^{Phe}, so verläuft die Deacylierungsreaktion im Falle von Phe - tRNA^{Phe} um den Faktor 7 langsamer, als die Deacylierung von intakter Phe-tRNA^{Phe} (59).

Untersuchungen wurden nun für das System Alanyl - tRNA^{Ala}₁ und Alanyl - tRNA - Synthetase aus Hefe durchgeführt. Intakte tRNA^{Ala}₁ sowie tRNA^{Ala}₁, die wie in Kap. 2.3.1. beschrieben ist im Anticodon gespalten war, wurde unter Standardbedingungen (s. Methodenteil) aminoacyliert. Die Synthetase wurde durch wiederholte Phenolbehandlung aus dem Reaktionsgemisch entfernt, und die niedermolekularen Komponenten durch Chromatographie an Sephadex G 25 abgetrennt.

Alanyl - tRNA^{Ala}₁ und gespaltenen Alanyl - tRNA^{Ala}₁ wurden wie in der Legende zu Abbildung 12 beschrieben mit und ohne

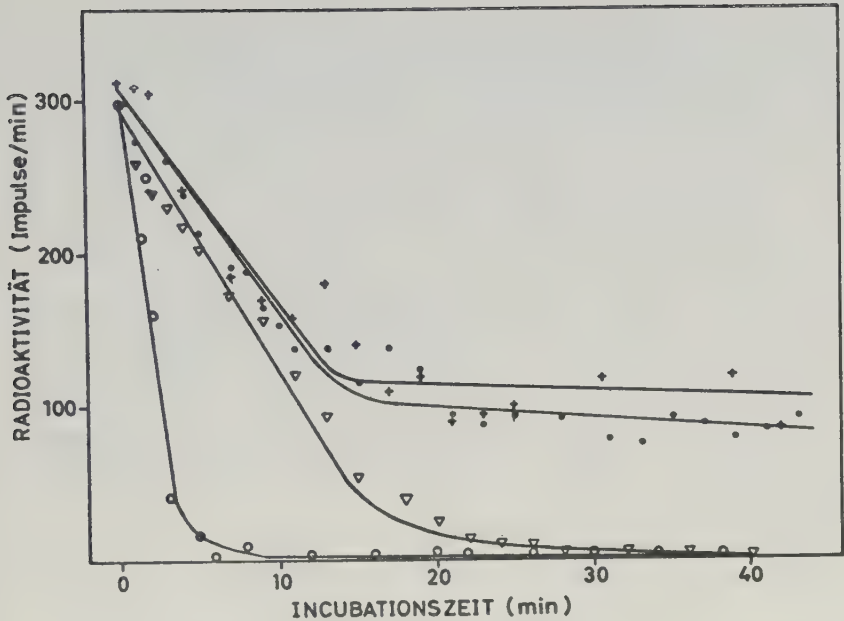


Abbildung 12: Einfluß der Spaltung im Anticodon auf das Ausmaß der spontanen und der durch Alanyl - tRNA - Synthetase katalysierten Deacylierung von Alanyl - tRNA₁^{Ala}.

¹⁴C - Alanyl - tRNA₁^{Ala} und im Anticodon gesplattene Alanyl - tRNA₁^{Ala} (jeweils 10 000 Impulse / Minute) wurden in 3 ml Puffer (15 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 2 mM PP_i , pH 7,3) mit und ohne Alanyl - tRNA - Synthetase bei 37° inkubiert. Zur Messung der enzymatischen Deacylierung wurden zum Inkubationsgemisch 1 200 mEinheiten Synthetase zugegeben. Zu bestimmten Zeiten wurden aliquote Teile entnommen und die mit Trichloressigsäure fällbare Radioaktivität bestimmt.

Bei den Werten für im Anticodon gesplattene

Alanyl - tRNA^{Ala}₁ sind die Beiträge, die im Spaltungsgemisch noch vorhandene intakte tRNA^{Ala}₁ lieferte, bereits subtrahiert. Der Anteil an ungespaltener tRNA im Spaltungs - gemisch war mit Hilfe der analytischen Disk - elektrophorese bestimmt worden.

♦ ♦ ♦ ♦ ♦ ♦ ♦	spontane Deacylierung von Ala - tRNA ^{Ala} ₁
• • • • • • •	spontane Deacylierung von ge - spaltener Ala - tRNA ^{Ala} ₁
◊ ◊ ◊ ◊ ◊ ◊ ◊	enzymkatalysierte Deacylierung von Ala - tRNA ^{Ala} ₁
▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼	enzymkatalysierte Deacylierung von gespaltener Ala - tRNA ^{Ala} ₁ .

Alanyl - tRNA - Synthetase inkubiert. Es zeigte sich (Ab - bildung 11), daß die Spaltung im Anticodon kaum einen Einfluß auf das Ausmaß der spontanen Deacylierung hatte, wohingegen die enzymatische Deacylierung im Falle von ge - spaltener Alanyl - tRNA^{Ala}₁ um einen Faktor von 4 - 5 lang - samer verlief, als die Deacylierung von ungespaltener Alanyl - tRNA^{Ala}₁. Diese experimentellen Befunde sind den in Ref. 59 beschriebenen analog.

2.7. Versuche zum Nachweis und zur Aminoacylierung von heterologen Komplexen der Halbmoleküle aus $\text{tRNA}_{\text{Hefe}}^{\text{Ala}_1}$ und aus $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{Val}_1}$

Interessante Aufschlüsse bezüglich der Region der tRNA, die für die spezifische Erkennung der korrespondierenden Aminoacyl - tRNA - Synthetase verantwortlich ist, sollten möglich sein durch die Untersuchung von Hybridmolekülen aus Fragmenten verschiedener tRNAs. Der Vergleich der Primärstrukturen und der Kleeblattmodelle der bisher sequenzierten tRNAs gab Anlaß zu der Annahme, daß sich aus Halbmolekülen verschiedener tRNAs Komplexe von einer gewissen Stabilität bilden können.

Die beiden Phenylalanin - spezifischen tRNAs aus Hefe und aus Weizenkeimlingen unterscheiden sich in 16 der 76 Nukleotide (60,61). Obwohl bei den heterologen Kombinationen der Halbmoleküle aus den beiden tRNAs nicht alle Wasserstoffbrücken ausgebildet werden können, assoziieren die Halbmoleküle in Lösung zu Hybriden (62) und sind mit Phenylalanin beladbar (63). Diese experimentellen Befunde erlauben den Schluß, daß nicht alle Basenpaare zur Syntheseerkennung erforderlich sind.

Eine noch engere Eingrenzung der Erkennungsregion sollte möglich sein, wenn ein Komplex aus Halbmolekülen verschiedenen akzeptierender tRNAs nur mit einer der beiden spezifischen Aminoacyl - tRNA - Synthetasen beladbar wäre. Aus

der CCA - Hälfte der tRNA^{Ser} aus Hefe und der pG - Hälfte von tRNA^{Phe} aus Hefe könnte sich ein Hybridmolekül von einer gewissen Stabilität bilden, da die Möglichkeit zur Ausbildung von insgesamt 7 Basenpaaren im Akzeptor- und Anticodonstamm besteht. Doch obwohl die Aggregation dieser Fragmente zu einem heterologen tRNA - Molekül nachzuweisen ist, ist eine Aminoacylierung dieses Komplexes unter Standardbedingungen nicht möglich (22).

Hybridmoleküle von größerer Stabilität sollten sich aus den Halbmolekülen der tRNA^{Ala}₁ aus Hefe und der tRNA^{Val}₁ aus E.coli ausbilden können. Aus den Kleeblattmodellen der Hybride (Abbildung 2) ist zu ersehen, daß die Kombination aus der CCA - Hälfte der tRNA^{Ala}₁ und der pG - Hälfte der tRNA^{Val}₁ die Möglichkeit zur Ausbildung von 6 Basenpaaren im Akzeptorstamm und weiteren 4 Basenpaaren im Anticodonstamm bietet, wohingegen die umgekehrte Kombination aus der pG - Hälfte der tRNA^{Ala}₁ und der CCA - Hälfte von tRNA^{Val}₁ die Ausbildung von insgesamt 8 Basenpaaren im Anticodon- und Akzeptorstamm ermöglicht. Denkbare heterologe Kombinationen aus Halbmolekülen der meisten anderen bisher sequenzierten tRNAs lassen die Ausbildung von weit weniger Basenpaaren zu. Zudem sind die meisten Basenpaare, die sich in den Hybriden aus den Halbmolekülen der tRNA^{Ala}₁ aus Hefe und der tRNA^{Val}₁ aus E.coli ausbilden können, G-C Basenpaare, die stabiler als A-U Basenpaare sind. Auch ist ein Großteil dieser Basenpaare benachbart - ein weiterer Grund für eine erhöhte Stabili-

tät diese Hybridmoleküle im Vergleich zu hybriden tRNAs, bei denen die Basenpaare getrennt sind.

Zur Bildung eines heterologen Komplexes aus Halbmolekülen der $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ und der $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ wurden Mischungen der Hälften unter den Bedingungen vorinkubiert, die zur Bildung von homologen Komplexen aus den Halbmolekülen der $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ und der $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ geführt hatten (vgl. Kap. 3.5.). Das Ausmaß der Komplexbildung wurde, wie schon für die homologen Komplexe aus Halbmolekülen von $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ und $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ beschrieben (vgl. Kap. 3.5.), durch quantitative Auswertung der Densitogramme der analytischen Diskelektrophoresen unter nicht - dissoziierenden Bedingungen bestimmt (21). Die Beiträge, die Dimere zu den Banden im tRNA - Bereich lieferten (vgl. Abbildung 13) sind bei der Berechnung von Prozentangaben bereits subtrahiert.

Bei einem Mischungsverhältnis der Komponenten von 1 : 1 lagen nach Gelelektrophorese die Halbmoleküle bei jeder der beiden möglichen Kombinationen nur zu einem sehr geringen Ausmaß als Komplex vor. Dieser experimentelle Befund ist keineswegs überraschend, wenn man an die große Stabilität der Sekundärstrukturen denkt, die die Halbmoleküle durch inter- und intramolekulare Basenpaarung ausbilden können.

Die Bildung eines heterologen Komplexes war jedoch gegenüber der Ausbildung von Dimeren zu einem höheren Ausmaß

ermöglicht, wenn ein Halbmolekül mit einem großen Überschuß des anderen Halbmoleküls unter den in Ref. 47 beschriebenen Bedingungen vorinkubiert wurde. Bei einem zehnfachen Überschuß einer Komponente und nach 20-stündiger Vorinkubation bei 37° konnte das in der Inkubationsmischung im Unterschluß vorliegende Halbmolekül bis zu einem Ausmaß von etwa 50 Prozent in den heterologen Komplex überführt werden. In einigen Experimentreihen konnte eine direkte Zunahme der Bildung des heterologen Komplexes mit steigenden Mengen des im Überschuß eingesetzten Fragments beobachtet werden.

Mit beiden heterologen Fragmentkombinationen wurden Versuche zur Aminoacylierung unter Standardbedingungen (vgl. Methodenteil) ausgeführt. Ergebnisse solcher Einbauversuche sind in den Tabellen 4 und 5 zusammengefaßt.

Die Akzeptoraktivität beider Hybride wurde sowohl für Valin als auch für Alanin untersucht. In Kontrollversuchen wurde gleichzeitig die Akzeptoraktivität der analog behandelten isolierten Halbmoleküle bestimmt. Es konnte gezeigt werden, daß keines der Fragmente allein unter den angegebenen Vorinkubations- und Inkubationsbedingungen mit einer der beiden Aminosäuren beladbar war. Dies ist zugleich ein weiterer Hinweis dafür, daß die Halbmoleküle frei von Verunreinigungen durch das komplementäre Halbmolekül waren, da die hier gebrauchten Vorinkubationsbedingungen die gleichen waren, wie die zur Bildung von homologen Komplexen.

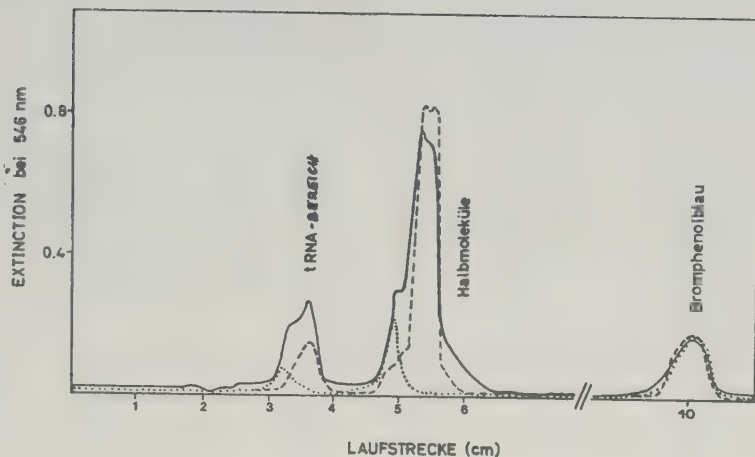


Abbildung 13: Superposition des Densitogramms einer Mischung der pG - Hälfte aus $\text{tRNA}_{1}^{\text{Ala}}$ und der CCA - Hälfte aus $\text{tRNA}_{1}^{\text{Val}}$ im Mischungsverhältnis 1 : 5 mit den Densitogrammen der einzelnen Komponenten in den gleichen Konzentrationen.

Alle Proben waren wie in Ref. 48 vorbehandelt.

Die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde unter nicht - dissoziierenden Bedingungen (21) durchgeführt.

_____ Gemisch der Halbmoleküle
 ----- pG - Hälfte der $\text{tRNA}_{1}^{\text{Ala}}$
 CCA - Hälfte der $\text{tRNA}_{1}^{\text{Val}}$

Tabelle 4: Aminoacylierung von heterologen Kombinationen von Halbmolekülen von tRNA^{Ala} aus Hefe und von tRNA^{Val} aus E.coli mit Alanin

Molares Verhältnis (CCA-Hälfte/ pg-Hälfte)	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	Akzeptoraktivität pMol Ala/ pMol Frag- ment	%	Akzeptoraktivität pMol Ala/ pMol Frag- ment	%	Akzeptoraktivität pMol Ala/ pMol Frag- ment	%
tRNA ^{Ala} (nicht vorinkubiert)	0,98		0,95		0,99	
tRNA ^{Ala} (vorinkubiert)	0,59	100	0,74	100	0,73	100
pg-Hälfte von tRNA ^{Ala} + CCA-Hälfte von tRNA ^{Ala}	0,65	114	0,65	87,2	0,73	102
pg-Hälfte von tRNA ^{Ala} + CCA-Val	0,00 0,04 0,05 - -	0,0 7,1 8,7 - -	0,002 - - 0,04 0,09	0,4 - - 4,8 12,8	0,00 - - 0,00 0,05	0,0 - - 0,0 6,0
pg-Hälfte von tRNA ^{Val} + CCA-Val	0,00 0,02 0,01 - -	0,0 0,4 2,2 - -	- 0,00 0,00 - -	- 0,0 0,0 - -	- - 0,00 0,00 0,02	- - 0,0 0,0 2,4

(Die Akzeptoraktivität ist jeweils berechnet auf die im Unterschuß eingesetzte Komponente)

Tabelle 5: Aminoacylierung von heterologen Kombinationen von Halbmolekülen von tRNA^{Ala}₁ aus Hefe und von tRNA^{Val}₁ aus E.coli mit Valin

Molares Verhältnis (CCA-Hälfte/ pg-Hälfte)	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	Akzeptoraktivität pMol Val/ment	%	Akzeptoraktivität pMol Val/ment	%	Akzeptoraktivität pMol Val/ment	%
tRNA ^{Val} (nicht vorinkubiert)	0,86		0,96		0,64	
tRNA ^{Val} (vorinkubiert)	0,51	100	0,76	100	0,467	100
pg-Hälfte von tRNA ^{Val} + CCA-Val Hälfte von tRNA	0,42	83	0,18	24	-	-
pg-Hälfte von tRNA ^{Ala} + CCA-Val	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0
1 : 1	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0
1 : 5	0,01	1,3	0,00	0,0	0,00	0,0
1 : 10	-	-	0,01	0,5	0,00	0,0
5 : 1	-	-	0,02	1,3	0,00	0,0
10 : 1	-	-	0,03	4,3	0,014	2,3
pg-Hälfte von tRNA ^{Val} + CCA-Val	0,00	0,0	0,03	4,3	0,00	0,0
1 : 1	-	-	0,06	8,2	0,026	4,9
1 : 5	-	-	0,04	4,8	0,065	13,4
1 : 10	0,02	4,6	0,02	2,2	0,00	0,0
5 : 1	0,05	8,7	0,03	3,1	0,043	8,9
10 : 1						

(Die Akzeptoraktivität ist jeweils berechnet auf die im Unterschluß eingesetzte Komponente)

Die in den Tabellen 4 und 5 präsentierten Daten zeigen, daß bei diesen Versuchen bevorzugt die Aminosäure eingebaut wurde, die der pG - Hälfte im Hybridmolekül entsprach. Die Kombination aus der pG - Hälfte der tRNA^{Ala}₁ und der CCA - Hälfte der tRNA^{Val}₁ ließen sich bei Mischungsverhältnissen der Komponenten, die eine Komplexbildung von 30 - 50 Prozent bewirken, bis zu einem Ausmaß von 5 - 12 Prozent mit Alanin beladen, jedoch nur zu maximal 3 Prozent mit Valin. Umgekehrt war eine Aminoacylierung des Hybrids aus der CCA - Hälfte der tRNA^{Ala}₁ und der pG - Hälfte aus tRNA^{Val}₁ mit Valin bis zu einem Ausmaß von maximal 13 Prozent möglich, mit Alanin jedoch nur zu etwa 2 Prozent. Die Prozentangaben für das Ausmaß der Aminoacylierung sind jeweils bezogen auf analog behandelte intakte tRNA in der gleichen Testreihe.

2.8. Untersuchung der Aminoacylierung von isolierten Fragmenten

Eine einfache Eingrenzung der Region, die für die spezifische Erkennung durch die korrespondierende Aminoacyl - tRNA - Synthetase verantwortlich ist, wäre auch möglich, wenn ein Fragment allein bereits acylierbar wäre. Die Beteiligung der fehlenden Regionen an der spezifischen Erkennung durch die Aminoacyl - tRNA - Synthetase könnte dann mit einiger Sicherheit ausgeschlossen werden. Findet jedoch keine Acylierung statt, so können keine Schlüsse

gezogen werden, denn es ist nicht auszuschließen, daß das geprüfte Fragment zwar die Nukleotidsequenzen enthält, die für die spezifische Synthetaseerkennung erforderlich sind, jedoch ohne bestimmte komplementäre Fragmente nicht die für die Wechselwirkungen mit der Synthetase erforderliche Tertiärstruktur annehmen kann.

Untersuchungen an isolierten Halbmolekülen nahmen ihren Ausgangspunkt an der Beobachtung, daß die CCA - Hälfte der tRNA^{Ser} aus Hefe in manchen Präparationen auch ohne das komplementäre Halbmolekül beladbar ist (22). Diese Befunde sind durch die Annahme zu erklären, daß das Halbmolekül zwar die Erkennungsregion für die Synthetase enthält, jedoch in manchen Präparationen in einer aktiven, in anderen wiederum in einer inaktiven Konformation an - fällt.

In Arbeiten von W. Wübbeler (25) sind ganz definierte Vorinkubationsbedingungen beschrieben, durch die es gelang, inaktive Konformationen der CCA' - Hälfte der tRNA^{Ser} in zur Aminoacylierung aktive umzuwandeln. Die aktive Konformation ist nur kurze Zeit stabil. Eine ähnliche Um - wandlung von inaktiven in aktive Strukturen konnte auch für die CCA - Hälfte der tRNA^{Phe} gezeigt werden (25).

2.8.1. Untersuchung der Aminoacylierung der CCA - Hälfte der tRNA^{Ala}₁ aus Hefe

In den vorhergehenden Kapiteln (2.5.1. , 2.7.) wurden verschiedene Bedingungen aufgezeigt, bei denen keine Aminoacylierung der CCA - Hälfte der tRNA^{Ala}₁ gefunden wurde. Erst bei der Rekombination des tRNA - Moleküls mit der pG - Hälfte konnte eine Aminoacylierung nachgewiesen werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß die CCA - Hälfte bereits die zur Synthetaseerkennung essentiellen Bereiche besitzt, jedoch in einer inaktiven Konformation vorliegt, und eine aktive Tertiärstruktur des CCA - Teils der tRNA durch die Rekonstitution des tRNA - Moleküls erreicht wird. Es war zu klären, ob eine solche Strukturumwandlung auch unter Vorinkubationsbedingungen zu erreichen war, wie sie für die 3' - terminalen Halbmoleküle aus tRNA^{Ser} und tRNA^{Phe} beschrieben sind (25).

Daher wurde zunächst versucht, die CCA - Hälfte der tRNA^{Ala} unter den Bedingungen zu aktivieren, die zur Ausbildung einer biologisch aktiven Konformation der CCA - Hälfte der tRNA^{Ser} geführt hatten. Um reproduzierbare Ausgangsbedingungen zu schaffen, wurden zunächst die zweiwertigen Ionen wie in Ref. 45 beschrieben entfernt. Nach dieser Behandlung war das 3' - terminale Halbmolekül unter Standardbedingungen nicht aminoacylierbar. Wurde danach das Fragment, wie für tRNA^{Ser} beschrieben, in einem thermo-

statisierten Inkubationsgefäß (vgl. Methodenteil) bei ungewöhnlich niedrigen Mg - Konzentrationen (1,75 mM MgCl_2 , 0,05 M Cacodylatpuffer, pH 7,5) für 1 Minute 45 Sekunden auf 35° vorinkubiert, so konnte auch das 3' - terminale Halbmolekül aus $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ nach raschem Abkühlen (innerhalb von 15 Sekunden) bei 37° aminoacyliert werden. Das Ausmaß der Beladung war jedoch gering (0,03 - 0,05 pMol Alanin / pMol CCA - Hälfte) und war zudem beträchtlichen Schwankungen unterworfen, sowohl in verschiedenen Versuchsreihen, als auch bei verschiedenen Proben einer Testreihe. Ähnliche Schwankungen waren bei Versuchsreihen zur Aminoacylierung der CCA - Hälfte der tRNA^{Phe} aus Hefe (25) und der $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ aus E.coli (vgl. 3.8.2.) beobachtet worden, nicht aber bei der Beladung des 3' - terminalen Fragments der tRNA^{Ser} aus Hefe.

Durch Variation der verschiedenen Parameter (Temperatur der Vorinkubation, Mg - Konzentration) wurde nach optimalen Bedingungen für die Aminoacylierung der $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ aus Hefe gesucht. In Abbildung 14 ist das Ausmaß der Aminoacylierung in Abhängigkeit von der Temperatur der Vorinkubation graphisch dargestellt. Die einzelnen Punkte der Kurve sind keine Meßdaten, sondern arithmetische Mittel der Daten aus Versuchsreihen. Eine solche Mittelung scheint zulässig, da immer eine Akzeptoraktivität gemessen wurde, wenn vor den Versuchen zur Aminoacylierung in der oben beschriebenen Weise vorinkubiert wurde. In keinem der Kontrollversuche, bei denen der Aminoacylierung keine Vorinkubation voranging,

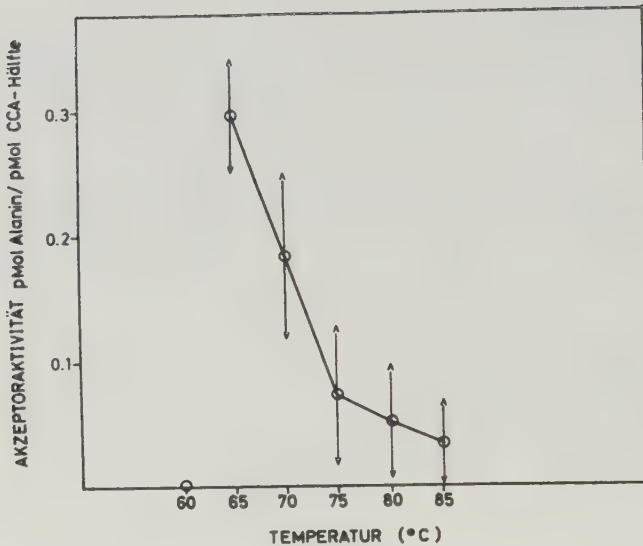


Abbildung 14: Ausmaß der Aminoacylierung der CCA - Hälfte der tRNA^{Ala}₁ aus Hefe in Abhängigkeit von der Temperatur der Vorinkubation.

0,342 A₂₆₀ - Einheiten CCA - Hälfte aus tRNA^{Ala}₁, die wie in Ref. 45 beschrieben Magnesium - frei dialysiert worden waren, wurden in 0,5 ml Puffer (1,75 mM MgCl₂, 0,05 M Cacodylatpuffer, pH 7,5) für 105 Sekunden auf die angegebene Temperatur erhitzt, innerhalb von 15 Sekunden auf 37° abgekühlt und unter Standardbedingungen (s. Methodenteil) aminoacyliert. Zu bestimmten Zeiten wurden aliquote Teile entnommen und die mit Trichloressigsäure fällbare Radioaktivität bestimmt.

Die in der Abbildung gezeigten Punkte sind keine Meßdaten, sondern arithmetische Mittel aus solchen Versuchsreihen. Die hier präsentierten Daten stammen aus 2 Versuchsreihen mit jeweils 6 Meßpunkten.

wurde eine Akzeptoraktivität des Fragments beobachtet.

Das beobachtete Maximum für die Aminoacylierung bei einer Temperatur der Vorinkubation von 65° stimmt gut mit den Daten aus anderen Versuchsreihen überein (Kap. 2.5. und 2.7.), die ebenfalls zeigten, daß eine Temperaturerhöhung auf 65° ausreichend ist, um die Tertiärstruktur der Halbmoleküle der $\text{tRNA}_{1}^{\text{Ala}}$ aufzufalten. Eine Vorinkubation bei Temperaturen unterhalb 65° führte nicht zu der erwünschten Strukturumwandlung. Alle nachfolgenden Versuchsserien wurden bei dem hier beobachteten Maximum für die Temperatur der Vorinkubation ausgeführt.

Ähnliche Versuchsreihen, in denen die Konzentration der Magnesiumionen variiert wurde, zeigten, daß das Optimum für die Salzbedingungen bei der Vorinkubation etwa dasselbe ist, wie bei der Aktivierung der CCA - Hälfte der tRNA^{Ser} (25), nämlich 1,75 mM MgCl_2 . Wurde eine Vorinkubation der CCA - Hälfte aus $\text{tRNA}_{1}^{\text{Ala}}$ jedoch bei Magnesiumkonzentrationen von 10 mM oder höher ausgeführt, so konnte keine Akzeptoraktivität des Fragments mehr gezeigt werden, was wiederum in Übereinstimmung mit den früher beschriebenen Versuchen (Kap. 2.5. und 2.7.) ist.

Die im nachfolgenden beschriebenen Versuchsreihen wurden unter den in bezug auf Temperatur und Salzkonzentration der Vorinkubation optimierten Bedingungen ausgeführt, In Abbildung 15 ist das Ausmaß der Aminoacylierung der CCA -

Hälfte aus $\text{tRNA}^{\text{Ala}}_1$ in Abhängigkeit von der Zeit aus einer Vielzahl derartiger Versuchsreihen unter gleichen Bedingungen zusammengefaßt. In allen diesen Versuchen konnte immer eine Aminoacylierung des Halbmoleküls nachgewiesen werden bei Proben, die auf die oben beschriebene Weise vorinkubiert waren, jedoch konnte keine Aminoacylierung aufgefunden werden, wenn den Einbauversuchen keine solche Vorinkubation vorangegangen war. Das Ausmaß der Aminoacylierung war beträchtlichen Schwankungen unterworfen (0,02 - 0,3 pMol Alanin / pMol CCA - Hälfte) und zwar sowohl innerhalb einer Versuchsreihe, als auch bei verschiedenen Versuchen.

Eine Erklärung für eine derartige Streuung der Werte konnte nicht gefunden werden. Auch Versuche, solche Schankungen durch eine Variation der technischen Ausführung der Experimente zu eliminieren, z.B. durch Zugabe von Träger - RNA bei der Fällung des aminoacylierten Fragments, schlugen fehl.

Bei der Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Amino - acylierung der CCA - Hälfte der tRNA^{Ser} hatte sich gezeigt, daß das Halbmolekül sehr schnell aminoacyliert wird, das Ausmaß der Aminoacylierung aber nach kurzer Zeit abnimmt. 20 Minuten nach Beginn der Inkubation ist keine Acylierung des Halbmoleküls mehr nachweisbar. Diese experimentelle Befund wird erklärt durch ein Acylierungs - Deacylierungs - Gleichgewicht und eine reversible Umwandlung der aktiven

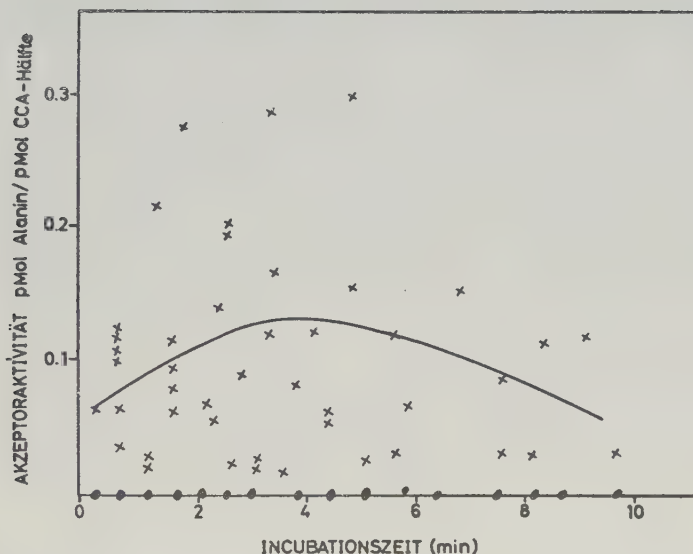


Abbildung 15: Ausmaß der Aminoacylierung der CCA - Hälfte aus tRNA_{Ala} in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Das Ausmaß der Aminoacylierung wurde bestimmt, wie in der Legende zu Abbildung 14 beschrieben. Die eingezeichneten Punkte sind Meßpunkte aus einer größeren Zahl von Versuchsreihen, die unter gleichen Bedingungen der Vorinkubation (1,75 mM MgCl_2 und 65°) ausgeführt wurden. Die eingezeichnete Kurve ist durch Punkte definiert, die sich durch arithmetische Mittelung der Werte von jeweils Einminuten - bereichen ergaben.

●●●●●●●●●●

Akzeptoraktivität ohne Vorinkubation

xxxxxxxxxxxx

Akzeptoraktivität mit Vorinkubation

Konformation der CCA - Hälfte aus tRNA^{Ser} in eine nicht mehr acylierbare Form.

Wegen der beträchtlichen Schwankungen, die im Ausmaß der Aminoacylierung der CCA - Hälfte der $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ auftraten, konnte eine Abnahme der Beladung mit der Zeit in den einzelnen Versuchsreihen nicht aufgefunden werden. So wurde versucht, bestimmte Gesetzmäßigkeiten für das Ausmaß der Aminoacylierung in Abhängigkeit von der Zeit abzuleiten, indem man die Ergebnisse aus einer größeren Zahl von Versuchsreihen miteinander verglich. Die einzelnen Punkte in Abbildung 15 entsprechen den experimentellen Ergebnissen aus 11 Versuchsreihen unter identischen Bedingungen der Vorinkubation. Der Verlauf der eingezeichneten Linie ergab sich durch Berechnung des arithmetischen Mittels aus den Werten bestimmter Zeitbereiche. Eine signifikante Abnahme der Aminoacylierung mit der Zeit, wie sie für das 3' - terminale Halbmolekül aus tRNA^{Ser} beschrieben ist (25), konnte für die CCA - Hälfte aus $\text{tRNA}_1^{\text{Ala}}$ nicht eindeutig nachgewiesen werden, doch zeigte sich (Abbildung 15), daß bei kürzeren Zeiten der Inkubation häufiger höhere Werte für das Ausmaß der Aminoacylierung gefunden wurden, als zu späteren Zeiten. Doch konnte auch nach 30 Minuten Inkubation zuweilen noch ein geringer Anteil an aminoacylierten Fragmenten aufgefunden werden.

2.8.2. Untersuchung der Aminoacylierung der CCA - Hälfte der tRNA^{Val}₁ aus E.coli

Bedingungen der Inkubation und Vorinkubation, bei denen keine Aminoacylierung der CCA - Hälfte der tRNA^{Val}₁ allein möglich war, sind in den Kapiteln 2.5.2. und 2.7. aufgezeigt. In diesem Abschnitt werden nun Untersuchungen der biologischen Aktivität der CCA - Hälfte aus tRNA^{Val}₁ unter Bedingungen beschrieben, die zur Ausbildung von aminoacylierbaren Konformationen der 3' - terminalen Halbmoleküle der tRNA^{Ser}, tRNA^{Phe} und tRNA^{Ala} (vgl. Ref. 24 und Kap. 2.8.1.) geführt hatten.

In allen nachfolgend beschriebenen Versuchsreihen zur Aminoacylierung der CCA - Hälfte aus tRNA^{Val}₁ wurde zur Vorinkubation eine Temperatur von 65° gewählt, die wie aus den Daten der in anderen Kapiteln präsentierten Versuche (2.5.2. und 2.7.) hervorgeht, ausreichend war, um die Tertiärstruktur der Halbmoleküle aus tRNA^{Val}₁ aufzufalten.

Versuchsreihen, in denen die Konzentration der Mg⁺⁺ - Ionen variiert wurde, zeigten, daß das Optimum für die Mg⁺⁺ - Konzentration bei der Vorinkubation für die Aktivierung der CCA - Hälfte aus tRNA^{Val}₁ wesentlich höher liegt, als das für die Aktivierung der CCA - Hälfte aus tRNA^{Ala}₁ bestimmte. Bei kleinen Mg⁺⁺ - Konzentrationen bei der Vorinkubation war das Ausmaß der Aminoacylierung

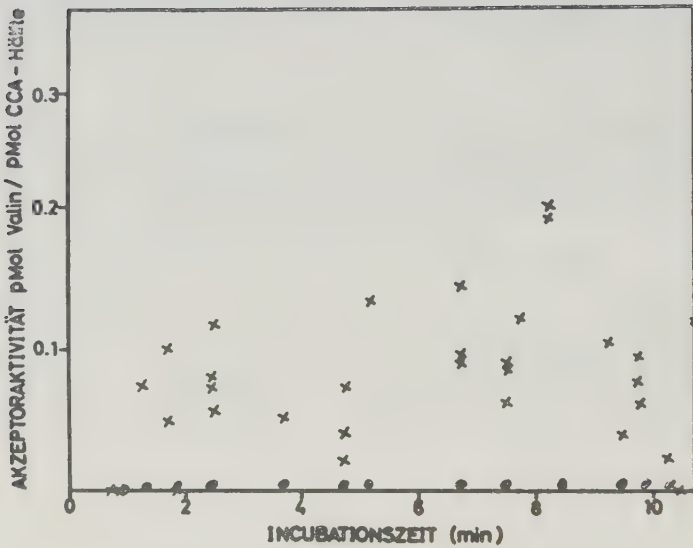


Abbildung 16: Ausmaß der Aminoacylierung der CCA - Hälfte aus $tRNA^{Val}_1$ in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Das Ausmaß der Aminoacylierung wurde bestimmt, wie in der Legende zu Abbildung 14 beschrieben. Die eingezeichneten Punkte sind Meßpunkte aus einer größeren Zahl von Versuchsreihen, die unter gleichen Bedingungen der Vorinkubation (3 - 4 mM $MgCl_2$ und 65°) ausgeführt wurden.

●●●●●●●

Akzeptoraktivität ohne Vorinkubation

xxxxxxx

Akzeptoraktivität mit Vorinkubation

der CCA - Hälfte der tRNA₁^{Val} gering (kleiner als 0,05 pMol Valin / pMol CCA - Hälfte) und beträchtlichen Schwankungen unterworfen. Zudem war zuweilen keine Akzeptoraktivität zu beobachten, obwohl den Versuchen zur Aminoacylierung eine Vorinkubation bei 65° und 1,75 mM MgCl₂ oder geringeren Mg⁺⁺ - Konzentrationen vorangegangen war. Andererseits war manchmal auch eine Beladung des Fragments in den Kontrollversuchen ohne Erhitzen aufzufinden.

Wurde jedoch die CCA - Hälfte der tRNA₁^{Val} bei 3 - 4 mM Mg⁺⁺ für 1 Minute 45 Sekunden bei 65° vorinkubiert, so war wiederum immer eine Akzeptoraktivität des Halbmoleküls feststellbar, keine jedoch in den Kontrollversuchen ohne Erhitzen. Fand eine Vorinkubation der CCA - Hälfte der tRNA₁^{Val} bei Magnesiumkonzentrationen von mehr als 10 mM statt, so konnte (- in Übereinstimmung mit den Daten aus den in Kap. 2.5.2. und 2.7. beschriebenen Versuchen -) keine Aminoacylierung gefunden werden.

Das Ausmaß der Aminoacylierung der CCA - Hälfte der tRNA₁^{Val} war, wie auch das der Beladung der 3' - terminalen Halbmoleküle aus tRNA^{Phe} und tRNA^{Ala} großen Schwankungen unterworfen. In Abbildung 16 sind die experimentellen Daten aus 7 Versuchsreihen in einer Graphik zusammengefaßt. Eine deutliche Abnahme der Akzeptoraktivität war in dem Zeitbereich bis zu 15 Minuten nach Beginn der Inkubation nicht zu beobachten.

3. Schlußwort:

In den beiden vorhergehenden Kapiteln sind Experimente zur Aminoacylierung von isolierten und von kombinierten Fragmenten beschrieben. Bei der Bestimmung der Akzeptoraktivität von heterologen Kombinationen aus Halbmolekülen von $\text{tRNA}_{\text{Ala}}^{\text{Ala}}$ aus Hefe und $\text{tRNA}_{\text{Val}}^{\text{Val}}$ aus E.coli zeigte es sich, daß jeweils eine Beladung des Hybridmoleküls mit der der pG - Hälfte entsprechenden Aminosäure möglich war. Durch die Ausbildung des heterologen Komplexes könnte die pG - Hälfte eine Konformation annehmen, die der in der intakten tRNA ähnelt. Die isolierten pG - Hälften konnten hingegen nicht aminoacyliert werden. Bei den im letzten Kapitel beschriebenen Versuchen wurde dagegen die Beobachtung gemacht, daß die isolierten CCA - Hälften von sowohl $\text{tRNA}_{\text{Ala}}^{\text{Ala}}$, als auch von $\text{tRNA}_{\text{Val}}^{\text{Val}}$ durch ihre korrespondierende Aminoacyl - tRNA - Synthetase beladbar waren, wenn sie zuvor bestimmten Bedingungen ausgesetzt waren, die eine Strukturumwandlung der Fragmente ermöglichen. Ohne Vorbehandlung war wiederum keine Aminoacylierung der Halbmoleküle zu beobachten.

Die Aminoacylierung der Fragmente war niemals vollständig, doch reproduzierbar. Der Komplex konnte bis zu einem Ausmaß von 0,13 pMol Aminosäure / pMol pG - Hälfte beladen werden, der durchschnittliche Grad der Beladung der isolierten vorbehandelten CCA - Hälften war 0,15 pMol

Aminosäure / pMol CCA - Hälfte. Da bei allen präsentierten Daten stets alle Kontrollwerte subtrahiert waren, sind sie trotz des relativ geringen Ausmaßes der Aminoacylierung signifikant. Bei beiden Annäherungen war eine Beladung der Fragmente abhängig von einer Vorbehandlung, die eine Strukturumwandlung bedingte.

Die in dieser Arbeit präsentierten experimentellen Daten lassen die Deutung zu, daß sowohl pG - Hälften, als auch CCA - Hälften aus beiden untersuchten tRNAs Strukturelemente enthalten, die die korrespondierende Aminoacyl - tRNA - Synthetase erkennen kann. Zusätzlich zu diesen Bereichen der Primärstruktur scheinen jedoch Elemente der Sekundär - und Tertiärstruktur der Molekülteile für die spezifische Erkennung durch die Synthetase unerlässlich zu sein.

4. Beschreibung der Versuche

4.1. Materialien

Unfraktionierte tRNA aus Brauereihefe und unfraktionierte tRNA aus E.coli wurden von der Fa. Boehringer, Mannheim bezogen. ATP wurde von der Fa. Zellstoff Waldhoff gekauft.

Brauereihefe stammte von der Fa. Merck, Darmstadt (Stamm Nr. 683) oder von der Hacker Brauerei, München; E.coli B oder E.coli K 12 wurden von der Fa. Merck, Darmstadt bezogen.

Die Nuklease aus B. Amyloliuefaciens wurde von Herrn F. Fittler nach Ref.⁴⁷ isoliert und für die Versuche zur Verfügung gestellt. Schlangengiftphosphodiesterase (EC 3.1.4.1.) aus Crotalus Adamanteus war von M. Petrova wie in Ref.⁵⁷ beschrieben hergestellt worden. T₁ - Ribonuklease (EC 3.1.4.8.) und T₂ - Ribonuklease (EC 2.7.7.17) wurden von der Fa. Sankyo, Co. , Tokio bezogen. Pankreas Ribonuklease (EC 2.7.7.16) war ein Produkt der Fa. Boehringer, Mannheim.

DEAE - Cellulose DE 52 stammte von der Fa. Whatman. Benzoylierte DEAE - Cellulose wurde von Serva Entwicklungslabor, Heidelberg bezogen. DEAE - Sephadex A50 war ein Produkt der Fa. Pharmacia, Uppsala, ebenso wie Sephadex G 25.

Reagentien waren, wenn nicht anders angegeben von der Fa. Merck, Darmstadt, Reinheitsgrad "p.A.". Radioaktive Aminosäuren wurden von der Fa. Radiochemical Centre Amersham erhalten. Die Substanzen für die Gelelektrophorese stammten vom Serva Entwicklungslabor, Heidelberg. "Stains all" wurde von der Fa. Eastman Kodak, Rochester, N.Y. gekauft. Cacodylsäure (The British Drug Houses Ltd.) wurde aus Äthanol : Wasser (1:1) umkristallisiert.

4.2. Vorbereitung von Ionenaustauschern

BD - Cellulose wurde vor Gebrauch gewaschen wie in Ref.³⁶ angegeben und dann mit dem entsprechenden Puffer aequilibriert. DEAE - Cellulose DE 52 wurde nach den Herstellerangaben vorbehandelt. DEAE - Sephadex A 50 wurde nach der Vorschrift von A. Nishimura et al (41) gewaschen und aequilibriert. Sephadex G 25 wurde nach dem Quellen 3 Stunden mit Phosphatpuffer pH 6,8 gekocht (64) , abgesaugt und mit dem gewünschten Puffer aequilibriert.

4.3. Chromatographie von tRNAs an BD - Cellulose

Analytische BD - Cellulose - Säulen wurden ausgeführt wie in Ref.³⁶ beschrieben. Zum Test von BD - Cellulose - Säulen bei Harnstoff und bei pH 3,0 wurden jeweils aliquote Teile der einzelnen Fraktionen (jeweils 100 µl) mit dem zweifachen Volumen Äthanol gefällt, zentrifugiert und der Niederschlag resuspendiert. Danach wurde die Ak-

akzeptoraktivität bestimmt (vgl. 4.7.)

4.4. Aminoacyl - tRNA - Synthetasen

Alanyl - tRNA - Synthetase aus Hefe (EC 6.1.1.7) und Valyl - tRNA - Synthetase aus E.coli (EC 6.1.1.8) wurden nach Aufschluß der Zellen und der Fraktionierung des Proteins durch Ammoniumsulfatfällung (vgl. Kap. 2.4.) weitergereinigt durch Chromatographie auf einer DEAE - Cellulose - Säule. Das Protein wurde gegen Puffer (0,02 M KH_2PO_4 , 0,001 M MgCl_2 , 0,02 M Mercaptoäthanol, 10 % Glycerin, pH 7,5) dialysiert, auf eine DEAE - Cellulose (2,4 x 24) aufgetragen, und mit 500 ml Dialysepuffer gewaschen. Anschließend wurde das Protein mit 0,25 M KH_2PO_4 , 0,001 M MgCl_2 , 0,02 M Mercaptoäthanol, 10 % Glycerin, pH 6,5 eluiert. Die Alanyl-tRNA - Synthetase wurde durch Dialyse gegen den letztgenannten Puffer, der zusätzlich 15 % Polyäthylenglycol enthielt, konzentriert und zu den Versuchen verwendet, die Valyl - tRNA - Synthetase wurde durch Chromatographie auf einer Sephadex A 50 Säule weiter angereichert. Die spezifischen Aktivitäten der verwendeten Enzyme sind in Kap. 2.4. genannt.

4.5. Spaltungen

Spaltungen wurden ausgeführt wie in den Legenden zu den Abbildungen oder in den angeführten Referenzen beschrieben. Zur Spaltung von $\text{tRNA}_{\text{Val}}^{\text{Val}}$ mit Pankreas-RNase wurden folgen-

de Bedingungen angewandt: 0,7 A₂₆₀ - Einheiten tRNA^{Val}₁ wurden in 100 μ l 50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, pH 7,5 mit 8 mEinheiten Pankreas-RNase für 9 Minuten bei 0° inkubiert. Die Reaktion wurde durch wiederholte Behandlung mit Macaloid (65) beendet.

4.6. Diskelektrophoresen

Analytische sowie präparative Gelelektrophoresen wurden ausgeführt wie in Ref.56 beschrieben. Bei den Gelelektrophoresen im präparativen Maßstab wurden die im Kap. 2.3.3. erwähnten und bei W. Wübbeler (25) beschriebenen Modifikationen angewandt. Gelelektrophoresen unter nicht - dissoziierenden Bedingungen wurden wie bei Thiebe et al.(21) beschrieben ausgeführt.

4.7. Vorinkubationsbedingungen und Aminoacylierungstests

Kombinationen der Fragmente wurden bei den in Ref.48 angegebenen Pufferbedingungen entweder für 24 Stunden im Wasserbad bei 37° inkubiert, oder im Trockenschrank 5 Minuten auf 65° erhitzt, und innerhalb von 20 Stunden auf 20° abgekühlt.

Die Vorinkubation zur Aktivierung von isolierten Fragmenten (vgl. Kap. 2.8.) erfolgte in einem thermostatisierten Inkubationsgefäß, dessen Temperatur schnell regulierbar war (beschrieben bei W. Wübbeler,25).

Die Akzeptoraktivität wurde wie in Ref.66 beschrieben gemessen.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im ersten Teil der Arbeit werden Methoden zur Darstellung von tRNAs und tRNA - Fragmenten beschrieben. Eine neue Methode zur tRNA - Fraktionierung, die Chromatographie an BD - Cellulose - Säulen in 7 M Harnstoff bei pH 3,0 wurde zur Abtrennung und Anreicherung der tRNA^{Ala}₁ aus Hefe wie auch der tRNA^{Val}₁ aus E.coli erfolgreich angewandt. Durch Kombination verschiedener Trennmethoden an BD - Cellulose konnte zudem eine bessere Auftrennung der tRNA^{Ala} - Spezies erreicht werden, als bei der bisher beschriebenen Isolierung. Weiter wurden die Alanyl - und Valyl - tRNA - Synthetase durch Kombination bekannter Verfahren angereichert.

Durch partielle enzymatische Spaltungen wurden aus tRNA^{Ala}_{Hefe} und aus tRNA^{Val}_{E.coli} tRNA - Hälften erhalten, die durch präparative Gelelektrophorese gereinigt wurden. Die Halbmoleküle waren nicht durch andere Fragmente verunreinigt, wie durch analytische Gelelektrophorese nachgewiesen wurde. Ein weiteres Kriterium für die Reinheit der Fragmente war, daß sie unter Bedingungen, die zu homologen, acylierbaren Komplexen der tRNA - Hälften führen würden, nicht mit Aminosäure beladbar waren.

Im zweiten Teil der Arbeit werden Untersuchungen über die Erkennungsregion der tRNA^{Ala}₁ aus Hefe und der tRNA^{Val}₁ aus

E.coli beschrieben. Es wurden im wesentlichen zwei Wege zur Annäherung an dieses Problem beschritten:

Nachdem durch die Untersuchung von homologen Komplexen aus den Halbmolekülen optimale Bedingungen für eine Assoziation der Fragmente bestimmt worden waren, wurde die Bildung der heterologen Komplexe untersucht. Es zeigte sich, daß für beide mögliche Kombinationen eine Komponente bei einem 10 - fachen Überschuß der anderen Komponente bis zu einem Ausmaß von 50 Prozent in den Komplex überführt werden konnte. Bei den Aminoacylierungsversuchen wurde in die Hälften bevorzugt die Aminosäure eingebaut, die der pG - Hälfte im Hybridmolekül entsprach. Das Ausmaß der Aminoacylierung war zwar gering (5 - 13 %), doch da alle erforderlichen Kontrollen ausgeführt wurden, dennoch aussagekräftig.

Andererseits konnten bei definierten Vorinkubationsbedingungen, insbesondere bei niedrigen Mg^{++} - Konzentrationen die isolierten CCA - Hälften von $tRNA_1^{Ala}$ und $tRNA_1^{Val}$ durch die korrespondierende Aminoacyl - tRNA - Synthetase aminoacyliert werden. Das Ausmaß der Aminosäurebeladung war zwar beträchtlichen Schwankungen unterworfen, jedoch war der Effekt eindeutig reproduzierbar, wenn eine entsprechende Vorinkubation vorangegangen war. Ohne Vorinkubation war keine Aminoacylierung der isolierten Fragmente möglich.

Eine Erklärung für diese experimentellen Daten, die zu -

nächst im Widerspruch zu stehen scheinen, wäre, daß die Spezifität der Wechselwirkungen zwischen tRNA und Aminoacyl - tRNA - Synthetase außer von Bestandteilen der Primärstruktur in hohem Maße von Merkmalen der Tertiärstruktur abhängig ist. Anscheinend enthalten sowohl CCA - Hälften, als auch pG - Hälften der untersuchten tRNAs Strukturmerkmale, die von den entsprechenden Synthetasen erkannt werden, doch ist die Ausbildung einer bestimmten Tertiärstruktur erforderlich, damit die Synthetase das Fragment erkennen kann.

6. Literaturverzeichnis:

1. v. Hippel, P. H. und McGhee, J. D. (1972) Ann. Rev. Biochem. 41, 231 - 300
2. Dickson, R. C. , Abelson, J. , Barnes, W. M. und Reznikoff, W. S. (1975) Science 187, 27 - 35
3. Müller - Hill, B. (1971) Angew. Chem. 83, 195 - 207
4. Kim, S. H. , Suddath, F. L. , Quigley, G. L. , McPherson, A. , Sussmann, J. L. , Wang, A. H. J. , Seeman, A. R. , und Rich, A. (1974) Science 185 , 435 - 440
5. Robertus, J. D. , Ladner, J. E. , Finch, J. T. , Rhodes, D. , Brown, R. S. , Clark, B. F. C. und Klug, A. (1974) Nature 250 , 546 - 551
6. Bernhard, D. und Darnell, J. E. (1969) J. Mol. Biol. 42, 43 - 56
7. Mowshowitz, D. B. (1970) J. Mol. Biol. 50, 143 - 151
8. Altman, S. (1971) Nature New Biol. 229, 19 - 20
9. Altman, S. und Smith, J. D. (1971) Nature New Biol. 233, 35 - 39
10. Fittler, F. und Hall, R. W. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 441 - 446
11. Gefter, M. L. und Russel, R. L. (1969) J. Mol. Biol. 39, 145 - 157
12. Roe, B. , Michael, M. und Dudock, B. (1973) Nature New Biol. 238, 72 - 74

13. Singer, C. E. , Smith, G. R. , Cortese, R. und Ames, B. N. (1972) Nature New Biol. 238, 72 - 74
14. Stewart, T. S. , Roberts, R. J. und Strominger, J. L. (1971) Nature 230, 36 - 38
15. Overath, H. , Fittler, F. , Harbers, K. , Thiebe, R. und Zachau, H. G. (1970) FEBS Lett. 11, 289 - 294
16. Loftfield, R. B. , Hecht, L. I. und Eigner, E. A. (1963) Biochim. Biophys. Acta 72, 383 - 390
17. Yarus, M. (1969) Ann. Rev. Biochem. 38, 841 - 880
18. Zachau, H. G. (1969) Angew. Chem. 81, 646 - 662
19. Dudock, B. DiPeri , C. , Scileppi, K. und Reszelbach, R. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 681 - 684
20. Schulman, L. H. und Chambers, R. W. (1968) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 61, 308 - 315
21. Thiebe, R. , Harbers, K. und Zachau, H. G. (1972) Eur. J. Biochem. 26, 144 - 152
22. Fittler, F. und Zachau, H. G. (1973) Arch. Biochem. Biophys. 155, 368 - 380
23. Harbers, K. , Thiebe, R. und Zachau, H. G. (1972) Eur. J. Biochem. 26, 132 - 143
24. Zachau, H. G. (1970) Nova Acta Leopoldina 194, 155 - 165
25. Wübbeler, W. (1975) Dissertation , Universität München

26. Holley, R. W. , Apgar, J. , Everett, G. A. , Madison, J. T. , Marquissee, M. , Merrill, S. H. , Penswick, J. R. und Zamir, A. (1965) Science 147, 1462 - 1464
27. Penswick, J. R. , Martin, R. und Dirheimer, G. (1975) FEBS Lett. 50, 28 - 31
28. Kimura, F. , Harada, F. und Nishimura, S. (1971) Biochemistry 10, 3277 - 3283
29. Holley, R. W. und Merrill, S. H. (1959) J. Amer. Chem. Soc. 81, 753
30. Zachau, H. G. , Tada, M. , Lawson, W. B. und Schweiger, M. (1961) Biochim. Biophys. Acta 53, 221 - 223
31. Thiebe, R. und Zachau, H. G. (1965) Biochim. Biophys. Acta 103, 568 - 578
32. Gilliam, I. , Milward, S. , Blew, D. , v. Tigerstrom, M. , Wimmer, E. und Tener, G. M. (1967) Biochemistry 6, 3043 - 3056
33. Maxwell, I. H. , Wimmer, E. und Tener, G. M. (1968) Biochemistry 7, 2629 - 2634
34. Gilliam, I. , Blew, D. , Warrington, R. C. , v. Tigerstrom, M. und Tener, G. M. (1968) Biochemistry 7, 3459 - 3468
35. Stern, R. und Littauer, U. Z. (1968) Biochemistry 7, 3469 - 3478
36. Fittler, F. , Kruppa, J. und Zachau, H. G. (1972) Biochim. Biophys. Acta 277, 513 - 521

38. Reeves, H.R. , Imura, N. , Schwam, H. , Weiss, G. B. , Schulman, L. H. und Chambers, R. W. (1968) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 60, 1450 - 1457
39. Crick, F. H. C. (1966) J. Mol. Biol. 19, 548 - 566
40. Penswick, J. R. und Holley, R. W. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 53, 543 - 566
41. Nishimura, S. , Harada, F. , Narushima, U. und Seno, T. (1967) Biochim. Biophys. Acta 142, 133 - 148
42. Penswick, J. R. (1966) Thesis, Ithaka, N. Y.
43. Apgar, J. , Everett, G. A. und Holley, R. W. (1966) J. Biol. Chem. 241, 1206 - 1211
44. Streeck, R. - E. und Zachau, H. G. (1971) FEBS Lett. 13, 329 - 391
45. Streeck, R. - E. und Zachau, H. G. (1972) Eur. J. Biochem. 30, 382 - 391
46. Holley, R. W. , Apgar, J. , Everett, G. A. , Madison, J. T. , Merrill, S. H. und Zamir, A. (1963) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 117 - 121
47. Nishimura, S. in Procedures in Nucleic Acid Research (Cantoni, G. L. und Davies, D. R. , eds) (1966) 56, Harper and Row, New York
48. Oda, K. , Kimura, F. , Harada, F. und Nishimura, S. (1969) Biochim. Biophys. Acta 179, 97 - 105
49. Yaniv, M. und Barrel, G. B. (1969) Nature, 222 , 278 - 279

50. Kern, D. (1972) Thèse , Strasbourg
51. Hirsch, R. und Zachau, H. G. , in Vorbereitung
52. Rigler, R. , Cronvall, E. , Hirsch, R. , Pachmann, U. und Zachau, H. G. (1970) FEBS Lett. 11, 320 - 323
53. Yaniv, M. und Gros, F. (1969) J. Mol. Biol. 44, 1 - 15
54. Muench, K.H. und Berg, P. in Procedures in Nucleic Acid Research (Cantoni, G. L. und Davies, D. R. eds) (1966) Harper and Row, New York
55. Bayev, A. A. , Fodor, I. , Mirzabekov, A. D. , Axelrod, V. D. und Kazarinova, L. Y. (1967) Molekularnaya Biologia 1, 714 - 723
56. Philippsen, P. und Zachau, H. G. (1972) Biochim. Biophys. Acta 277, 523 - 538
57. Petrova, M. , Philippsen, P. und Zachau, H. G. Biochim. Biophys. Acta, eingereicht zur Veröffentlichung
58. Bonnet, J. und Ebel, J. - P. (1972) Eur. J. Biochem. 31, 335 - 344
59. Bonnet, J. (1974) Biochimie 56, 541 - 545
60. RajBhandary, U. L. , Chang, S. H. , Stuart, A. , Faulkner, R. D. , Hoskinson, R. M. und Khorana, H. G. (1967) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57, 751 - 758
61. Dudock, B. S. , Katz, G. , Taylor, E. K. und Holley, R. W. (1969) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 62, 941 - 945

62. Wintermeyer, W., Thiebe, R., Zachau, H. G., Riesner, D., Römer, R. und Maass, G. (1969) FEBS Lett. 5, 23 - 27
63. Thiebe, R. und Zachau, H. G. (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 1024 - 1031
64. Adams, A., Lindahl, T. und Fresco, J. R. (1967) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57, 1684 - 1691
65. Stanley, W. M. jun. und Bock, M. (1965) Biochemistry, 4, 1302.- 1311
66. Zachau, H. G. in Bergmeyer, H. U., Methoden der Enzymatischen Analyse, Verlag Chemie Weinheim, 2. Auflage, 1828 - 1834
67. (1970) Eur. J. Biochem. 15, 203 - 208

7. Abkürzungsverzeichnis

A ₂₆₀	Extinktion bei 260 nm und 1cm Schichtdicke
BD - Cellulose	benzoylierte DEAE - Cellulose
CCA - Hälfte	3' - terminales Halbmolekül einer tRNA
DEAE -	Diäthylaminoäthyl -
pG - Hälfte	5' - terminales Halbmolekül einer tRNA
RNase	Ribonuklease
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA ^{Phe} _{-Y}	tRNA ^{Phe} nach Herausspalten der Base aus Y durch Säurebehandlung

Die Abkürzungen für Nukleoside, Nukleotide und Nukleinsäuren folgen den Regeln der IUPAC - IUB (67).

Lebenslauf

Am 14. August 1945 wurde ich in Planegg bei München geboren. Mein Vater Arno v. Lossow ist Bildhauer, meine Mutter Hilde v. Lossow, geborene Bösner Kaufmann.

Ich besuchte verschiedene Volksschulen in Gräfelfing und München und anschließend von 1957 - 1965 das Deutsche Gymnasium in München. An dieser Schule legte ich im Juli 1965 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1965 / 66 immatrikulierte ich mich an der Universität München für das Hauptfach Chemie. Im April 1968 legte ich die Diplomvorprüfung ab; die Diplomhauptprüfung fand im Dezember 1970 statt. Nach Beendigung der Diplomarbeit, die am Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie unter der Anleitung von Prof. H. G. Zachau durchgeführt wurde, erhielt ich am 15. Mai 1972 das Diplom für Chemie.

Die vorliegende Doktorarbeit entstand in der Zeit von Mai 1972 - Dezember 1974 unter der Anleitung von Prof. H. G. Zachau im Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie.

